FEVICORDINE

Eine neue Gruppe biologisch aktiver Naturstoffe aus Fevillea cordifolia vom 29-Norcucurbitan-Typ

Isolierung – Strukturaufklärung – Biologische Aktivität

vorgelegt von

Ursula Hefter-Bübl

aus Weiden/Opf.

Diss
Erlangen

1986 № 270

FEVICORDINE

Eine neue Gruppe biologisch aktiver Naturstoffe aus Fevillea cordifolia vom 29-Norcucurbitan-Typ

Isolierung – Strukturaufklärung – Biologische Aktivität

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Ursula Hefter-Bübl
aus Weiden/Opf.

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

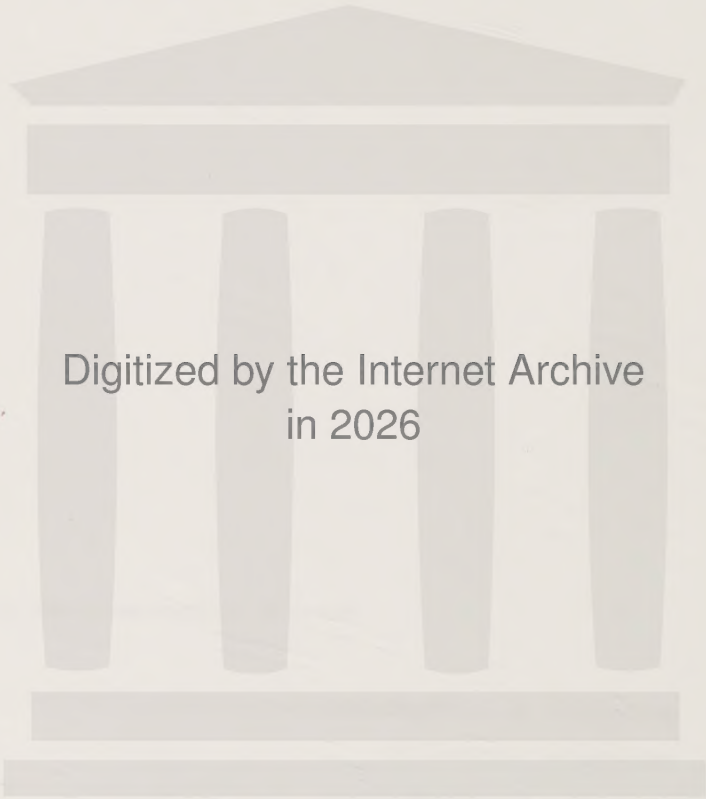
Tag der mündlichen Prüfung: 26.5.1986

Vorsitzender der Promotionskommission:	Professor Dr. K.Brodersen
Erstberichterstatter:	Professor Dr. H.Achenbach
Zweitberichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. E.U.Würthwein

Für Robert

Meinen Eltern

in Liebe und Dankbarkeit


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538118_0004

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1	Ziele und Bedeutung der Naturstoffanalytik	1
1.2	Botanik und Chemotaxonomie der Cucurbitaceen	2
1.3	Cucurbitaceen als Heil- und Nutzpflanzen	10
1.4	Ausgangspunkt und Ziel der Arbeit	11
2.	ALLGEMEINER TEIL	12
2.1	Fevillea cordifolia: Beschreibung, Verwendung und bekannte Inhaltsstoffe	12
2.2	Extraktion und Vorversuche	14
2.3	Isolierungsverfahren	17
2.3.1	Trennung des Methanol-Rohextraktes	17
2.3.2	Trennung des Methylenchlorid-Rohextraktes	22
2.3.3	Trennung des Petrolether-Extraktes	23
2.4	Strukturermittlung der glykosidischen Hauptkomponente	23
2.4.1	IR-Spektrum	24
2.4.2	Elektronen-Spektrum	25
2.4.3	Massenspektren	25
2.4.4	^{13}C-NMR-Spektren	30
2.4.5	Ableitung eines Strukturvorschlags	36
2.4.6	^{1}H-NMR-Spektren	41
2.5	Inkrementberechnungen zur Arbeitshypothese 33 a	46
2.6	NMR-Spektroskopische Spezialmessungen der Verbindung 20	50
2.6.1	^{1}H$\{^{1}$H$\}$-2D-NMR-Spektrum (COSY-P)	50
2.6.2	^{13}C$\{^{1}$H$\}$-2D-NMR-Spektren	55
2.7	Derivate und Abbauprodukte	66

2.7.1 Derivate zur Festlegung des Substitutionsmusters an Ring A 66

2.7.1.1 Herstellung des Aglykons Fevicordin A (43)..... 66

2.7.1.2 6,7-Dehydro-fevicordin A-2,3-dion (44) 72

2.7.1.3 Die Acetyl-Derivate von Fevicordin A-glucosid und Fevicordin A: 52 und 53 81

2.7.1.4 Methylierungs-Derivate 88

2.7.1.4.1 Fevicordin A-glucosid-monomethylether (56) und Fevicordin A-dimethylether (57) 88

2.7.1.4.2 Synthese von 2,3-Dimethoxy-1-methyl-tetralin 90

2.7.1.5 Herstellung von Fevicordin A-formaldehydacetal (63) ... 95

2.7.2 Abbau von Fevicordin-A-glucosid - bzw. Fevicordin-A-Derivaten - Festlegung der ungesättigten Seitenkette .. 99

2.7.2.1 Herstellung der 22-Hydroxy-Verbindungen durch Reduktion mit $NaBH_4$ 99

2.7.2.2 Abbau von Fevicordin A zu 16-Acetoxy-2,3-dimethoxy-4,9,14-trimethyl-19,29-bisnorpregna-1,3,5(10)-trien-11,20-dion (68)..... 101

2.7.3 Derivate zur Festlegung der glykosidischen Bindung in Fevicordin A-glucosid (20) 104

2.7.3.1 Abbau von Fevicordin-A-glucosid-monomethylether (56) zu 2-Hydroxy-3-methoxy-4,9,14-trimethyl-19,29-bisnor-pregna-1,3,5(10),16-tetraen-11,20-dion (70) und dessen Acetylierungsprodukt (71)..... 104

2.8 Strukturermittlung von Nebenkomponenten 110

2.8.1 Fevicordin B-glucosid (73)..... 110

2.8.2 Fevicordin C-glucosid (77) und Fevicordin D-glucosid (78) 114

2.8.3	Fevicordin E-glucosid (82)	117
2.8.4	Fevicordin A und B (43) und (88)	123
2.9	Charakteristische Fettsäuren aus den Samen von *Fevillea cordifolia*	124
2.10	Ergebnisse und Diskussion	126
2.11	Biogenetische und chemotaxonomische Aspekte	132
2.12	Pharmakologische Aspekte	139
3.	EXPERIMENTELLER TEIL	146
3.1	Geräte und Methoden	146
3.2	Pflanzenmaterial	149
3.2.1	Vorbereitung zur Extraktion	150
3.2.2	Extraktion	150
3.2.3	Vorversuche	151
3.2.4	Trennung der Rohextrakte	152
3.2.5	Beschreibung der chromatographischen Trennungen	152
3.2.6	Beschreibung der isolierten Verbindungen	163
3.2.6.1	Glucoside	163
3.2.6.2	Genuine Aglyka	167
3.2.7	Beschreibung der hergestellten Derivate	168
3.2.7.1	Glucosid-Derivate	168
3.2.7.2	Aglyka-Derivate	186
3.2.8	Synthesen	202
3.2.9	Fettsäuren des Samenfettes	205
3.3	Strukturen der beschriebenen Verbindungen	206
4.	ZUSAMMENFASSUNG	208
5.	LITERATURVERZEICHNIS	212

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

abs.	absolut
β-gluc	β-glucosyl
bt	breites Triplett
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie, Dünnschichtchromatogramm
DCCC	Droplet-Counter-Current-Chromatographie
DCI	Direkte chemische Ionisation
EI	Elektronenstoß-Ionisation
GC	Gaschromatographie
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
IR	Infrarot
i. Vak.	im Vakuum
KG	Kieselgel
min.	Minute(n)
q	Quartett
m, dm	Multiplett, doppeltes Multiplett
MS	Massenspektrometrie
rel. Int.	Relative Intensität
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Schmp.	Schmelzpunkt
t	Triplett
t_R	Retentionszeit (GC, HPLC)
u.a.	unter anderem
u. Ph.	untere Phase
UV	Ultraviolett

Dem Leiter dieser Arbeit, meinem verehrten Lehrer

Herrn Prof. Dr. H.Achenbach

möchte ich für seine Unterstützung, seine stete Diskussionsbereitschaft sowie zahlreiche wertvolle Ratschläge und Anregungen danken.

Herrn A.Mühlenfeld und besonders Herrn Dr. R.Waibel danke ich herzlich für die Aufnahme von Kernresonanz- bzw. Massenspektren, ihre ständige Bereitschaft zur Diskussion und für ihre Hilfe bei der Lösung spektroskopischer Probleme.

Frau Lüling schulde ich Dank für die Aufnahme von IR- und UV-Spektren sowie die Durchführung der Plattendiffusions-Tests.

Herrn Dr. Hahn danke ich für die Unterstützung bei den Fettsäureuntersuchungen.

Mein Dank gilt ferner den Firmen Schering und Schwabe für die Durchführung der pharmakologischen Untersuchungen.

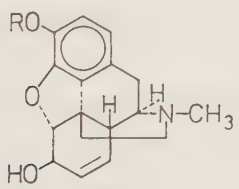
1. EINLEITUNG

1.1 Ziele und Bedeutung der Naturstoffanalytik

Das Vorkommen niedermolekularer Naturstoffe in einer Pflanze interessiert nicht nur Biologen, sondern auch Mediziner und Pharmazeuten, denn viele Stoffe des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels weisen biologische Aktivität auf.

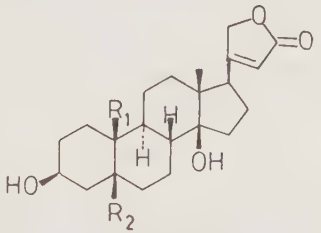
Dabei spielen die Alkaloide eine wichtige Rolle. Als Beispiel sei hier Morphin (1) genannt, Hauptinhaltsstoff des *Papaver somniferum*. Es stellt den Prototyp der stark wirksamen Analgetika dar. Zusammen mit zahlreichen Nebenalkaloiden, z.B. dem Codein (2), das als Antitussivum therapeutische Bedeutung erlangte, ist es im Rohopium enthalten und wird daraus gewonnen [1,2].

Aber auch stickstofffreie Verbindungen, wie etwa die herzwirksamen Glykoside von Digitoxigenin (3) aus *Digitalis*-Arten [3] oder k-Strophanthidin (4) aus *Strophantus*-Arten [3], sind häufig Träger biologischer Wirkungen. Das Pflanzenreich stellt also eine wichtige Rohstoffquelle für viele Arzneimittel dar.



1 R= H

2 R=CH_3



3 R_1=CH_3, R_2=H

4 R_1=CHO, R_2=OH

Volksheilkundliche Verwendung bestimmter Pflanzen kann ein Hinweis auf das Vorliegen von aktiven Wirkstoffen sein. Dem Naturstoffchemiker fällt dann die Aufgabe zu, pflanzliche Inhaltsstoffe als potentielle Träger der biologischen Wirkung aus den vielen von der Pflanze produzierten Verbindungen zu isolieren und deren Struktur zu ermitteln.

Dabei ergibt sich meist eine chemotaxonomische Orientierungsmöglichkeit aufgrund der systematischen botanischen Einordnung der betreffenden Pflanze, denn Gemeinsamkeiten der verschiedenen Taxa treten nicht nur in der Morphologie, sondern auch im Bereich der Inhaltsstoffe auf.

1.2 Botanik und Chemotaxonomie der Cucurbitaceen

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit den Samen der Pflanze Fevillea cordifolia L., die im tropischen Südamerika beheimatet ist und den Cucurbitaceen angehört. Deshalb soll hier etwas näher auf die Botanik und Chemotaxonomie dieser Familie eingegangen werden.

Cucurbitaceen sind überwiegend krautige Pflanzen, selten Halbsträucher oder kleine Bäume. Viele Arten sind Klimmer und besitzen rankenförmige Kletterorgane, die Tendrillen.

Die Familie bewohnt vor allem die subtropischen und tropischen Regionen der Erde. In Europa sind nur wenige Arten nördlich der Alpen vertreten, z.B. Bryonia dioica, die Zaunrübe. Man unterscheidet etwa 90 - 100 Genera mit 750 - 800 Arten. Aufgrund morphologischer Merkmale werden 112 Genera innerhalb folgender fünf Tribus beschrieben [4,5]:

Fevilleae, Melothriae, Cucurbitae, Sicyoeae und Cyclanthereae.

Zum Tribus Fevilleae gehört Fevillea cordifolia. Beispiele für die Cucurbitae stellen dar: Citrullus colocynthis (Koloquinten), Citrullus lanatus (Wassermelone), Cucumis sativus (Gurke) und Cucurbita pepo (Kürbis).

Physiologische Aktivitäten von Pflanzen der Cucurbitaceae sind schon seit dem Altertum bekannt; sie wurden wegen ihrer Toxizität gefürchtet, trotzdem als Heil- und Nutzpflanzen verwendet *).

Die charakteristischen chemischen Merkmale der Familie sind fette Öle in den Samen, sowie triterpenoide Saponine und toxische "Bitterstoffe", die ebenfalls dem Terpenstoffwechsel entstammen und bemerkenswerte Inhaltsstoffe darstellen [4].

Vor allem Früchte der Cucurbitaceae schmecken bitter, abgesehen von den durch Züchtung gewonnenen Kulturformen (Gurken, Kürbisse).

Cucurbitacine

In älteren Veröffentlichungen [6,7] wird allgemein von bitter schmeckenden "Harzen", bitteren amorphen Pulvern berichtet. Den meisten Untersuchern gelang es nicht, reine Wirkstoffe zu isolieren.

Erst in den fünfziger Jahren erhielt die Forschung Aufschwung und neues Interesse durch die Beobachtung von Belkin und Fitzgerald, daß Extrakte aus Bryonia-Wurzeln und Koloquinten tumornekrotisierende Eigenschaften besitzen [8].

---

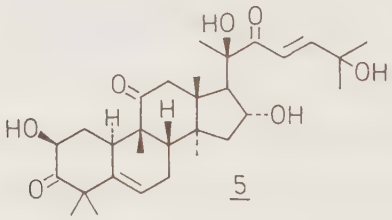
*) Da ging einer auf's Feld, um Kraut zu sammeln, und fand ein Rankengewächs und pflückte sein Kleid voll mit wilden Gurken. Und als er kam, schnitt er's in den Topf zum Gemüse - sie kannten's aber nicht - und legte es den Männern zum Essen vor. Als sie nun von dem Gemüse aßen, schrieen sie und sprachen: O Mann Gottes, der Tod im Topf! Denn sie konnten's nicht essen -

Die Bibel, Elisa, 2. Buch der Könige, Kapitel 4, Vers 39 - 40

Arbeitsgruppen um Enslin [9-17], Rehm [18-20] und Lavie [21-29] befaßten sich anschließend intensiv mit den Inhaltsstoffen der Cucurbitaceen, und es gelang die bitter schmeckenden Komponenten rein zu isolieren.

Sie wurden Cucurbitacine genannt, stellten eine neue Verbindungsklasse dar und ihre Struktur wurde 1962 endgültig abgeklärt [30-32].

Die vorher verwendeten Bezeichnungen wie Elatericin A oder B (aus Ecballium elaterium) wurden geändert und die verschiedenen Cucurbitacine nach der Reihenfolge der Isolierung durch Enslin et. al. [9-17] alphabetisch benannt. So war z.B. das früher isolierte Elatericin A identisch mit Cucurbitacin D (5).



5

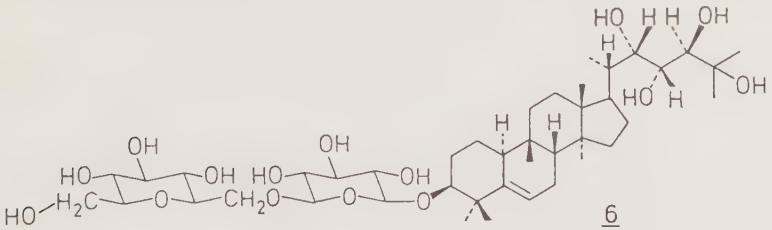
Auf Struktureigentümlichkeiten und biologische Wirkungen der Cucurbitacine wird im Rahmen dieser Arbeit noch ausführlicher eingegangen (siehe Abschnitt 2.4, 2.11, 2.12).

Oft liegen die Cucurbitacine in glucosidisch gebundener Form vor. Meist werden sie von einem pflanzeneigenen β-glucosidischen Enzym, der Elaterase, das Berg (1897) erstmalig im Preßsaft der Früchte von Ecballium elaterium nachwies [33], begleitet. Bei der Extraktion mit wasserhaltigen Lösungsmitteln kommt es dann zur Freisetzung der

Aglyka aus den Cucurbitacin-β-Glykosiden. Die Aglyka kristallisieren im Gegensatz zu den Glykosiden gut und konnten dadurch rein erhalten werden. Sie sind für spektroskopische Untersuchungen, wie für die damals erstmals angewandte ^{1}H-NMR-Spektroskopie, wesentlich besser geeignet, da sie weniger komplexe Spektren im Bereich der Carbinolprotonen (3 - 4,5 ppm) aufweisen und damit leichter interpretierbar sind. Das Cucurbitacin-"Muster" der verschiedenen Pflanzenteile ist ausgesprochen artbedingt und gleichzeitig abhängig vom Entwicklungszustand der Pflanze [34]. Außer in den Cyclanthereae wurden bisher in allen Tribus Cucurbitacine nachgewiesen [4].

Momordicoside

In jüngerer Zeit wurde von einer Reihe cucurbitacinähnlicher Substanzen, den Momordicosiden, isoliert aus Momordica charantia, berichtet. Eine japanische Arbeitsgruppe um Miyahara [35], klärte u.a. die Struktur von Momordicosid A (6) auf. Die Momordicoside zeichnen sich im Vergleich zu den Cucurbitacinen durch die fehlende 11-Keto-Funktion und andere Seitenketten aus [36].



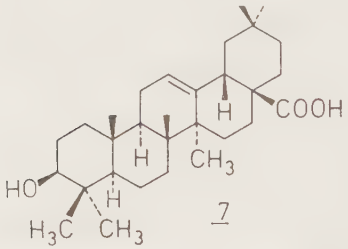
6

Saponine, pentacyclische Triterpene und Sterine

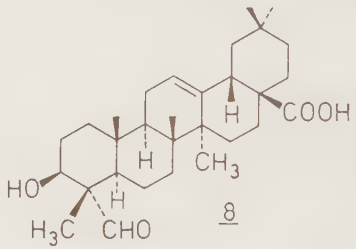
Saponine mit pentacyclischem Triterpen-Aglykon sind in der Familie der Cucurbitaceen ebenfalls weit verbreitet, wobei sie entweder alleine oder auch neben den Cucurbitacinen auftreten. Noller [37], Kuwada [38] und Djerassi [39] haben viel zur Kenntnis der Chemie dieser Saponine beigetragen. Häufig vertreten sind z.B. folgende Sapogenine:

Oleanolsäure (7) u.a. aus Luffa acutangula [40]

Gypsogenin (8) u.a. aus Luffa operculata [39].



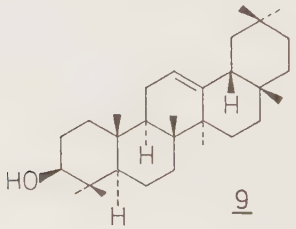
7



8

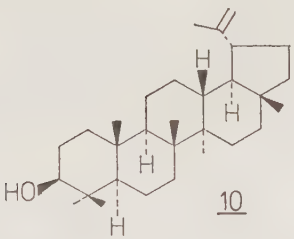
Meist aus dem unverseifbaren Anteil des Samenfettes erhalten wurden z.B.:

β-Amyrin (9), u.a. aus Coccinia indica [41]



9

Lupeol (10), u.a. aus Coccinia indica [41].

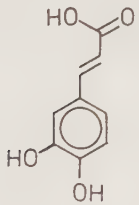


10

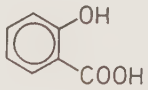
Phenolische Verbindungen

Aus Cucurbita pepo isoliert wurden z.B.

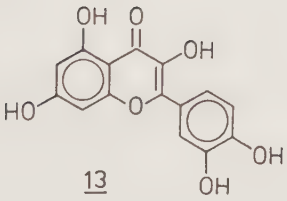
Kaffeesäure (11) [42], Salicylsäure (12) [43], Quercetin (13) [42] und Kämpferol (14) [42].



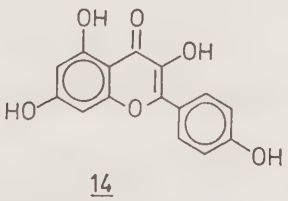
11



12



13

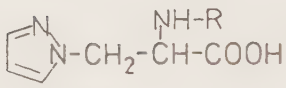


14

Stickstoffhaltige Verbindungen

Es kommen charakteristische Aminosäuren vor, wie z.B.:

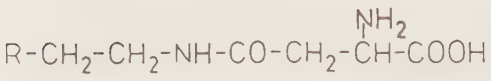
β-Pyrazol-1-yl-L-alanin (15) oder γ-L-Glutamyl-β-pyrazol-1-yl-L-alanin (16), die u.a. aus Cucumis sativus-Samen [44] isoliert wurden:



15 R = H

16 R = HOOC-CH(NH$_2$)-(CH$_2$)$_2$-CO

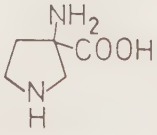
N-Ethyl-L-asparagin (17) und N-(2-hydroxyethyl)-L-asparagin (18) konnten u.a. in Bryonia dioica-Kraut [45] nachgewiesen und in größerer Menge isoliert werden:



17 R = H

18 R = OH

Cucurbitin (=3-Amino-3-carboxypyrrolidin) (19) wurde aus Cucurbita moschata erhalten [46].



19

In der älteren Literatur wird für eine erhebliche Anzahl von Cucurbitaceen Alkaloidvorkommen erwähnt (Zusammenstellung [4,5]); es wurden basische, stickstoffhaltige Stoffe kristallisiert erhalten und der Art entsprechend benannt, wie z.B. Bryonicin, Momordicin, Luffanin, Fevilletin. Die meisten dieser Basen wurden durch Peckolt [6,7]

beschrieben, konnten jedoch in ihrer Struktur nicht aufgeklärt werden. Hegnauer [4] zieht daraus den Schluß, daß einige der sogenannten "Alkaloide" mit einzelnen der in neuerer Zeit aufgefundenen charakteristischen Aminosäuren, die bereits erwähnt wurden, identisch sein könnten.

Kohlehydrate

Über den Kohlehydratstoffwechsel als chemotaxonomisches Merkmal gibt es nur sehr wenige Untersuchungen. So wurde z.B. reichliches Vorkommen von Mannit in der Samenschale von Citrullus vulgaris beschrieben [47].

Flüchtige Geruchsstoffe

Es sollen häufig unangenehm riechende Stoffe vorkommen, die jedoch nicht weiter untersucht und charakterisiert wurden [48].

Fette Öle der Samen

Das Endosperm der Samen enthält im allgemeinen 20 - 30 % Eiweiß und 30 - 50 % Öl, wobei zwei verschiedene Öltypen vorkommen.
Der erste Öltyp enthält neben wenig gesättigten Fettsäuren vorwiegend Öl- und Linolsäure, aber keine dreifach ungesättigten Fettsäuren (Speiseöltyp). Zu diesem Typ gehören z.B. die Öle von Cucumis- und Luffa-Arten [4].
Der zweite Öltyp ist durch einen hohen Anteil an dreifach ungesättigten Fettsäuren mit konjugierten Doppelbindungen gekennzeichnet (Leinöltyp). α-Elaeostearinsäure [= (Z,E,E) Octadeca -9,11,13-triensäure] und

Trichosansäure [= (Z,Z,E) Octadeca-9,11,13-triensäure], seien als charakteristische Säurekomponenten genannt [4,5]. Dieser Öltyp kommt u.a. in Momordica-, Apodanthera- und Cucurbita-Arten vor [49-51].

1.3 Cucurbitaceen als Heil- und Nutzpflanzen

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß trotz des Vorkommens von bitteren und toxischen Stoffen die Familie der Cucurbitaceen einen wichtigen Beitrag zur menschlichen Ernährung liefert. Viele als Gemüse kultivierte und auf "süßen" Geschmack gezüchtete Arten werden als Nutzpflanzen geschätzt (Kürbis, Melone, Gurke).

Werden die Samen richtig aufbereitet können nicht-bittere und nicht-toxische Speise- oder Gebrauchsöle gewonnen werden (siehe Abschnitt 1.2)

In Ländern anderer Kulturkreise werden saponinhaltige Arten als Waschmittel genutzt [5].

Cucurbitaceen fanden und finden zum Teil heute noch Anwendung als "Drogen" zu Heilzwecken.

Fructus colocynthidis und Radix Bryoniae z.B. wurden als Laxantien und Drastika verwendet. Da sie einen ausgeprägt bitteren Geschmack haben, fanden sie sich auch als Amara in appetitanregenden Zubereitungen [52].

Samen von Cucurbita moschata werden als anthelmintisch wirksam beschrieben. Hieraus wurde das bereits erwähnte Cucurbitin (19) isoliert, das das Wachstum von Schistosoma japonicum hemmt [46].

Die Samen von Telfairia pedata werden im tropischen Südostafrika von den Eingeborenen als Tonicum und Galaktagogum verwendet. Wirksamkeit sollen sie auch bei Magenbeschwerden und Rheuma besitzen [53].

1.4 Ausgangspunkt und Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit Inhaltsstoffen der Samen von Fevillea cordifolia L. (F. scandens; F. punctata Poir) aus der Familie der Cucurbitaceen [54]. Fevillea cordifolia gehört zum Tribus der Fevilleae.

Anlaß zur Untersuchung der Pflanze war eine angebliche Nutzung der Samen zu kontrazeptiven Zwecken; weiterhin wird von einer antirheumatischen Wirkung berichtet [55].

Ziel der Arbeit war, Inhaltsstoffe aus den Samen zu isolieren und deren Struktur zu ermitteln. Die isolierten Verbindungen sollten anschließend unter dem Aspekt der volksheilkundlichen Anwendung diskutiert werden.

2. ALLGEMEINER TEIL

2.1 Fevillea cordifolia: Beschreibung, Verwendung und bekannte Inhaltsstoffe

Fevillea cordifolia L. ist eine kletternde Pflanze, die im tropischen Südamerika von Costa Rica bis Ecuador, im Amazonas-Gebiet und auf den Antillen verbreitet ist. Die Früchte haben einen Durchmesser von 10 - 12,5 Zentimeter, sind von kugeliger Gestalt und von einer hölzernen Schale mit grünlicher Farbe umgeben. Sie enthalten 12 braune Samen, die 5 - 6 cm breit und 2 cm dick sind. Sie sind paarweise im Fruchtfleisch eingebettet [56,57] (Siehe Abb. 1a, 1b)

Abb. 1: Fevillea cordifolia - Frucht (a) und Samen (b)

Volksheilkundlich verwendet werden die Samen.

Die Vielfalt in der Namensgebung deutet auf häufige Gebrauchs- und Anwendungsmöglichkeiten hin. Die Indianer nennen sie zum Beispiel "Shinaherwo" [55]. Weitere Namen sind "Semen Nhandirobae" oder "Noix de serpent" [58,59].

Das gelbliche Fett der Samen ist von fester Konsistenz und wird als "Nhandiroba"- oder "Sekua"-Fett bezeichnet; es wird für technische Zwecke wie für die Herstellung von Seifen, Kerzen und Rostschutzmitteln genutzt [59]. Die Abkochung der Samen [58] wird in der mittelamerikanischen Volksheilkunde als starkes Emetikum, Purgans und Antidot ("contraveneno") bei Vergiftungen angewendet. Zerkleinerte Samen in Rum oder Wein werden bei Schlangenbissen eingenommen, während eine Paste, die aus den Samen gewonnen wird, auf die Bißwunde gelegt wird. Abkochungen der Samen sollen auch gegen Malaria und Gelbfieber wirksam sein [58,60].

Pulverisierte Samen in Alkohol werden als Einreibung gegen Rheuma und Lumbago angewendet; auch von Pflastern, die auf Verrenkungen aufgelegt werden, wird berichtet [58].

In der Veterinärmedizin wird Fevillea cordifolia bei Magen- und Darmerkrankungen von Pferden und anderen Tieren genutzt [58,60].

Bisher ist die Pflanze nur sehr wenig untersucht worden. Die frühesten Literaturangaben stammen von Peckolt [6,7]. Er gibt eine grobe quantitative Analyse der Samen an. Danach sollen sie 32,5 % fettes Öl, einen amorphen Bitterstoff, genannt "Fevillin", eine "kristallinische Substanz" (ohne weitere Angaben), Glucose, 3,4 % Harz und insgesamt 9,1 % "Harzsäuren" enthalten. Eine andere Literaturstelle nennt einen Fettgehalt von 55 - 66 % [61].

Der erwähnte amorphe Bitterstoff wird nicht weiter charakterisiert, so daß anzunehmen ist, daß es nicht gelang, eine reine Verbindung zu erhalten und Strukturuntersuchungen vorzunehmen.

Die einzige ausführliche Veröffentlichung [62] über Fevillea cordifolia

behandelt die Zusammensetzung des Samenöls und die Fett-Kennzahlen: Die Anwesenheit von 9,11,13-Octadecatriensäure wird beschrieben, so daß man das Fevillea-Öl dem Leinöltyp zuordnen kann (Siehe Abschnitt 1.2)

Entsprechendes gilt für die Arten Fevillea trilobata und Fevillea peruviana, über die nur Angaben bezüglich der Fett-Zusammensetzung vorliegen [63]. Über andere sekundäre Inhaltsstoffe dieser Arten gibt es keine publizierten Untersuchungen.

2.2 Extraktion und Vorversuche

Die Applikation von Fevillea cordifolia erfolgt peroral; 2 - 3 Tage vor einer Kohabitation wird eine tägliche Dosis genommen [55].

Nach Berichten eines Medizinmannes aus Costa Rica wird die Droge folgendermaßen zubereitet [55]: Die Samen werden von ihrer harten braunen Schale befreit und die zwei weißen, weichen Keimblätter (= Endosperm) des Innern von noch anhaftender Haut durch Abschaben befreit. Das Endosperm wird mit einem Stein zu einem Brei verrieben und davon eine Menge, die der "Größe einer Mandel" entspricht, in Wasser suspendiert eingenommen.

Nach dieser Beschreibung bereiteten wir das Material zur Extraktion vor. Da die Samen geschält zur Anwendung kommen, verwendeten wir nur das weiche Innere der "Nüsse" (Samen).

Wir fertigten für die ersten Voruntersuchungen aus einer kleinen Menge (4 Samen) nach Schälen, Zerkleinern und Entfetten mit Petrol-

ether einen methanolischen Rohextrakt an.

Methanol ist ein bewährtes Lösungsmittel für viele verschiedene Substanzklassen. Es kommt in seinen Lösungseigenschaften dem Wasser am nächsten, hat aber den Vorteil, einen tieferen Siedepunkt zu besitzen, wodurch das Extraktionsgut thermisch weniger belastet wird.

Um einen Überblick über Polarität und chromatographisches Verhalten der extrahierten Stoffe zu erhalten, wurde der Methanol-Rohextrakt in Wasser/Methanol 1/1 aufgeschlämmt und nacheinander zwischen CCl_4, Diethylether, CH_2Cl_2 und Essigester verteilt. Die einzelnen Extrakte untersuchten wir dünnschichtchromatographisch und verglichen die auftretenden Fleckmuster mit dem ursprünglichen Methanol-Rohextrakt. In CCl_4 lösten sich Fettreste und Spuren von Stoffen geringer Polarität, die dann weitgehend quantitativ im CH_2Cl_2- und Diethylether-Extrakt erschienen. Insgesamt betrug der Anteil der in CH_2Cl_2 löslichen Stoffe nur etwa 4 %, eine Menge, die zu gering erschien, um eine Extraktion mit CH_2Cl_2 zu rechtfertigen.

Im Essigester-Extrakt ließen sich ca. 30 - 40 % des Methanol-Extraktes in der organischen Phase anreichern. Essigester erwies sich als wenig geeignet für die Verteilung, da eine gallertige Masse entstand und die Trennung der Phasen nur langsam und schlecht erfolgte.

Man erprobte verschiedene DC-Systeme, um Laufverhalten und Polarität der jeweils angereicherten Stoffe zu untersuchen und behandelte mit selektiven Sprühreagenzien [64], um erste Hinweise auf bestimmte Naturstoffklassen zu erhalten. Aus den Beobachtungen ließ sich schließen, daß terpenoide Verbindungen den überwiegenden Anteil des Methanol-Rohextraktes ausmachten.

Weiterhin war zu bemerken, daß sich die mit Essigester extrahierbaren Verbindungen und etwa die Hälfte des verbliebenen methanolisch-wässrigen Extraktes in Fließmitteln chromatographieren ließen, die gewöhnlich zur Trennung von glykosidischen Verbindungen verwendet werden.
Die andere Hälfte des methanolisch-wässrigen Extraktes bestand aus Stoffen, die selbst in Fließmitteln wie $CHCl_3$/Methanol/Wasser (5/4/1; organische Phase) nicht auf KG-DC wanderten. Solches Laufverhalten zeigen z.B. Oligosaccharide; dieser Extraktanteil wurde nicht weiter untersucht.

Der Versuch, Alkaloide mit Cer-IV-ammoniumsulfat, Mayer's- oder Dragendorff's-Reagenz nachzuweisen, verlief negativ [64].

Nach diesen Voruntersuchungen wurden für die erste Soxhlet-Extraktion Petrolether und Methanol als Lösungsmittel gewählt (siehe Abschnitt 3.2.2). Zu einem späteren Zeitpunkt wurde eine Nachlieferung aufgearbeitet und ebenfalls einer Soxhlet-Extraktion unterworfen. Hierbei wurde das zerkleinerte Samenmaterial mit Benzin, CH_2Cl_2 und Methanol extrahiert. Dadurch konnten gewisse sauerstoff- und lichtempfindliche Verbindungen quantitativ abgetrennt werden. Auf diese Weise ließen sich die Temperaturbelastung und Dauer der Extraktionszeiten für diese Verbindungen verkürzen und eine Kieselgel-Passage umgangen werden, so daß die Verluste bei Isolierung geringer wurden.

Durch Ausschütteln des Methanol-Rohextraktes zwischen $CHCl_3$/ Methanol/Wasser (5/6/4) konnten die hauptsächlich untersuchten Verbindungen in der $CHCl_3$-Phase gezielt angereichert werden.

2.3 Isolierungsverfahren

2.3.1 Trennung des Methanol-Rohextraktes

Gel-Permeations-Chromatographie

Zur Abtrennung höher molekularer Stoffe ist die Gel-Permeations-Chromatographie die Methode der Wahl. Mit Sephadex LH-20® [65], oder Merck PVA-500® erfolgt die Separierung vor allem nach der Molekülgröße, da Partikel mit sehr großem Molekulargewicht nicht in die Gelporen eindringen können, in der Lösungsmittelfront außerhalb der Gelpartikel wandern und so zuerst eluiert werden.

Die Einführung der Gelchromatographie (1959) [66] im wässrigen Medium führte bald zu Versuchen, diese Technik auch für Trennungen in organischen Lösungsmitteln anzuwenden.

Sephadex-Typen z.B. sind Dextran-Gele, bei denen die Dextran-Ketten zu einem dreidimensionalen Polysaccharid-Netz querverknüpft sind. Durch Einführung von verschiedenen Substituenten, z.B. Verätherung der Glucose-Einheiten mit Hydroxypropyl-Gruppen, kann das Verhältnis der hydrophilen zu den lipophilen Anteilen variiert werden. Daraus resultiert ein jeweils anderes Quellvermögen der verschiedenen Gele.

Sephadex G® - Typen quellen in sehr polaren organischen Lösungsmitteln, wie Dimethylformamid oder DMSO. Sephadex LH-20® quillt in Wasser

und Alkoholen, aber auch in $CHCl_3$ oder Aceton, so daß es für eine Vortrennung gut geeignet schien, da der Methanol-Rohextrakt nur zum Teil wasserlöslich ist.

Das verwendete Lösungsmittel trägt in gewissem Umfang auch zur Trennung bei, durch die unterschiedliche Löslichkeit von Verbindungen ähnlicher Molekülgrößen in der mobilen Phase.

Vorteil der Methode ist, daß die stationäre Gelphase immer wieder verwendet werden kann. Nachteilig wirkt sich aus, daß jeweils nur eine relativ kleine Menge aufgetragen werden kann, daß sich die Güte der Trennung wie auch bei anderen Chromatographie-Arten nach der Durchflußgeschwindigkeit richtet und diese Methode dadurch recht zeitaufwendig wird.

Adsorptions-Chromatographie an Kieselgel unter Überdruck

Wesentlich schneller kann eine Vortrennung mit Hilfe einer sogenannten "Flash-Chromatographie" erfolgen, die zu recht groben Fraktionen führt. Ein Versuch wurde unternommen in der Hoffnung, die zeitraubende Sephadex-LH-20®-Vortrennung umgehen zu können. Der Methanol-Extrakt erwies sich jedoch als zu zäh, klebrig und so schlecht in Chloroform löslich, daß erst nach 12-stündigem Einwirken von $CHCl_3$/Methanol (98/2) eine langsame und vorsichtige Chromatographie unter Überdruck möglich war.

Adsorptions-Chromatographie an Kieselgel (SiO_2)

Da sich die Trennschärfe bei herkömmlicher Trennung an SiO_2 als wesentlich besser erwies, nahm man den Zeitverlust in Kauf und es wurde auch die Vortrennung des Methanol-Rohextraktes über Kieselgel bei

Normaldruck vorgenommen. Die weitere Separierung der so gewonnenen Großfraktionen erfolgte ebenfalls an Kieselgel mit anderen Lösungsmittelsystemen oder anderen Methoden, die jetzt noch kurz erläutert werden.

Verteilungs-Chromatographie an Gelen

An Gelen sind Trennungen auch durch Verteilungsvorgänge möglich [65]. Das Gel wird dabei in einem von zwei nicht miteinander mischbaren Lösungsmitteln gequollen, z.B. in Essigester. Dabei nimmt das Gel das organische Lösungsmittel auf und wird dadurch zu einer stationären Phase mit sehr großem Volumen und guter Stabilität. Mit Hilfe des zweiten Lösungsmittels als mobile Phase, z.B. Wasser, erhält man ein System, in dem die zu trennenden Substanzen auf Grund ihres Verteilungskoeffizienten im betreffenden Lösungsmittelsystem verschieden lange von der stationären Phase "festgehalten" bzw. mit der mobilen eluiert werden. In der Literatur ist eine erfolgreiche Trennung von Prostaglandin-Methylestern mit Heptan/$CHCl_3$/Ethanol (10/10/1) an Sephadex LH-20® beschrieben [67]. Ein weiteres Beispiel nennt die Trennung von Cucurbitacin-Glykosiden an LH-20® mit Essigester/Wasser/Ethanol (95/95/10) [68]. Vorteile der Methode sind wiederum, daß das Gel nach Regeneration wieder verwendet werden kann, kaum Substanzverluste durch Adsorption auftreten und oft gute Trennergebnisse erzielt werden können.

Begrenzende Faktoren dieser Methode sind die Kombinierbarkeit der Systeme, da das Gel in verschiedenen Lösungsmitteln unterschiedlich stark quillt. Es kann während der Chromatographie zu Quell- oder

Schrumpfungs-Vorgängen kommen, die die Güte der Trennleistung beeinträchtigen.

Verteilungschromatographie mit der DCC-Methode

Die Droplet-Counter-Current-(= DCC)Chromatographie ist eine Methode zur präparativen Trennung, die seit Beginn der siebziger Jahre an Bedeutung gewinnt [69]. Sie beruht auf dem Prinzip der Gegenstrom-Verteilung, das schon bei älteren Trennmethoden genutzt wurde (Craig-Verteilung [70]). Prinzipiell gibt es zwei Verteilungsmethoden, eine kontinuierliche und eine diskontinuierliche. Zu letzterer gehört das in jedem Labor gängige "Ausschütteln" einer Substanz in einem Schütteltrichter. Der ersteren ist die DCCC zuzurechnen.
Es handelt sich um ein Verfahren, bei dem die beiden flüssigen Phasen nicht miteinander mischbar sind. Das Gerät besteht aus 300 - 500 senkrecht stehenden Säulen (Ø 2 - 4 mm, 30 - 60 cm), die miteinander durch Teflonschläuche verbunden sind. Je nachdem, ob die stationäre oder die mobile Phase schwerer ist, wird die aufsteigende oder absteigende Methode gewählt. Auf Grund des Dichteunterschiedes der zwei Lösungsmittel bilden sich beim Durchpumpen der mobilen Phase durch die mit der stationären Phase gefüllten Säulen an der feinen Kapillaröffnung Tröpfchen, die sich nach oben oder unten bewegen. Am Ende der Glassäule wird die mobile Phase durch den Teflonschlauch der nächsten Säule zugeführt. Durch die an der Oberfläche der Tröpfchen entstehenden "Turbulenzen" findet die Verteilung der Probe zwischen den beiden Phasen statt. Der Trennungsvorgang beruht auf dem Nernst'schen Gesetz, wonach sich eine Substanz mit einem bestimmten Quotienten in zwei nicht

miteinander mischbaren Phasen verteilt. Je nachdem, ob die Affinität zur mobilen Phase größer oder kleiner ist, wird die Substanz früher oder später eluiert.

Der Vorteil gegenüber automatischen Schüttelapparaturen, die zwischen 1940 und 1960 vorwiegend eingesetzt wurden, besteht in der kontinuierlichen Arbeitsweise und dem wesentlich geringeren Lösungsmittelverbrauch. Vorteile gegenüber herkömmlichen SiO_2- oder anderen Adsorbentien ist die Möglichkeit der schonenden und praktisch verlustfreien Isolierung empfindlicher Stoffe, auch in kleinen Mengen. Polare und sehr polare Verbindungen wie Glykoside sind ebenfalls gut mit Hilfe der DCCC zu trennen [71,72].

Nachteilig wirkt sich aus, daß es nur eine begrenzte Anzahl von Systemen gibt, die Tröpfchen der benötigten Größe ergeben. Es sind auch nur sehr wenige wasserfreie geeignete Systeme beschrieben, so daß hydrolyse-gefährdete Stoffe auf diese Weise nur mit Einschränkung zugänglich sind.

Ein weiteres Problem stellt die Löslichkeit der Substanzproben dar, denn das aufzutragende Gemisch muß in beiden Phasen löslich sein und klar filtriert aufgegeben werden. Die Trenngüte eines Systems läßt sich nicht voraussagen.

Für die Wahl des Lösungsmittel-Systems wird das dünnschichtchromatographische Verhalten der zu trennenden Proben untersucht: Man trägt auf Kieselgel auf und eluiert mit der organischen wassergesättigten Phase des Lösungsmittelsystems. Bei Rf-Werten, die höher als 0.5 sind, wird die weniger polare Phase als mobile Phase eingesetzt, bei Rf-Werten unter 0.5 die polarere Phase.

Hochdruck-Flüssig-Chromatographie

Trennungen an RP-18-Phasen waren in einigen Fällen nötig, wenn mit den oben genannten Trennverfahren keine reinen Substanzen erhalten wurden; man arbeitete mit Methanol/Wasser-Gemischen.

2.3.2 Trennung des Methylenchlorid-Rohextraktes

Der CH_2Cl_2 - Extrakt bestand zur Hälfte aus Fettresten, ein Viertel waren glykosidische Verbindungen, die auch im Methanol-Extrakt anfielen und das letzte Viertel enthielt zuckerfreie Verbindungen, die sich bald als sauerstoff- und lichtempfindlich herausstellten. Die mit Abstand besten Trennergebnisse ließen sich mit HPLC und - unter gewissen Vorsichtsmaßnahmen - auch mit Adsorptionschromatographie an SiO_2 erzielen. Chromatographie mit $CHCl_3$/Methanol-Gemischen an SiO_2 führte zu größeren Substanzverlusten durch Zersetzungserscheinungen; bessere Ergebnisse ließen sich beim Übergang auf Cyclohexan/Essigester oder Toluol/Essigester erzielen. Es bewährte sich auch, in kleinen "Portionen" mit schneller Tropfgeschwindigkeit über kurze SiO_2-Säulen zu chromatographieren, um den Kontakt zum Adsorbens möglichst kurz zu halten. Eine weitere Vorsichtsmaßnahme war das Entgasen der verwendeten Lösungsmittel, Lichtschutz und das Einengen des Lösungsmittels nach der Fraktionierung unter N_2-Begasung.

2.3.3 Trennung des Petrolether-Extraktes

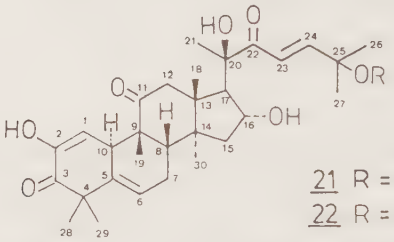
Triglyceride wurden mit Natriummethylat umgesetzt und mittels GC aufgetrennt.

2.4 Strukturermittlung der glykosidischen Hauptkomponente

Ein wesentliches Ergebnis der Voruntersuchungen war die Beobachtung, daß eine DC-einheitliche Verbindung in relativ großer Menge im methanolischen Rohextrakt vorlag, die mit Terpenoid-Sprühreagenzien anfärbte [64]. Als eine der unpolareren Verbindungen reicherte sie sich bei der Verteilung zwischen Methanol/Wasser und Essigester (siehe Abschnitt 2.2) in der organischen Phase an. Verschiedene Isolierungsverfahren wurden erprobt: Über Kieselgel eluierte man mit $CHCl_3$/Methanol/Wasser (7/2/1; organische Phase) die entsprechende Fraktion. Es stellte sich jedoch heraus, daß zwei Verbindungen zusammen anfielen. Auf mit $AgNO_3$ vorbehandelten DC-Platten zeigte sich eine in wesentlich geringerer Menge vorhandene Nebenkomponente mit etwas höherem Rf-Wert und anderem Anfärbeverhalten (siehe Abschnitt 2.8.1). Die Trennung gelang über PVA 700 mit 0.1 M-$AgNO_3$/Aceton (75/25) oder über Kieselgel mit Essigester/Methanol (9/1). Die Hauptkomponente 20 war durch Umkristallisieren aus $CHCl_3/H_2O$ oder Aceton/H_2O rein zu erhalten.

Da Cucurbitacine eine Substanzklasse mit weiter Verbreitung in der Familie der Cucurbitaceae sind, wurden UV-, MS-, ^{13}C-NMR- und ^{1}H-NMR-Spektren von 20 zunächst mit denen von Cucurbitacinen verglichen. Es

ergaben sich übereinstimmende Strukturmerkmale mit Cucurbitacin E (21) und Cucurbitacin I (22), aber auch signifikante Abweichungen.



Polarität und Laufverhalten auf DC von 20 wies auf einen glykosidischen Charakter hin. Eine Enzymspaltung mit Cellulase war erfolgreich und das entstehende Aglykon wurde mit wesentlich höherem Rf-Wert und gleichem Anfärbeverhalten auf DC detektiert. In quantitativ geringerem Umfang spaltete auch β-Glucosidase die glykosidische Bindung von 20.

Das Aglykon verfärbte sich beim Liegenlassen des DC an der Luft schnell gelb. Dies war ein erster Hinweis auf die Oxidationsempfindlichkeit der Verbindung.

2.4.1 IR-Spektrum

Das IR-Spektrum von 20 weist eine ausgeprägte OH-Bande bei 3440 cm^{-1} auf, was mit dem glykosidischen Charakter in Übereinstimmung ist. Zwei Banden bei 1685 und 1720 cm^{-1} zeigen die Anwesenheit von Carbonylgruppen im Molekül. Eine Resonanzlinie bei 1370 cm^{-1} spricht für eine CO-gebundene Methylgruppe, also eine Acetylfunktion. All diese Merkmale mit den zugehörigen Bandenlagen sind auch bei ent-

sprechenden Cucurbitacin-IR-Spektren beschrieben [73]. 20 hat bei 1630 und 1490 cm^{-1} zwei starke Banden, die Cucurbitacine nicht aufweisen. Daraus konnte geschlossen werden, daß Abweichungen im Doppelbindungsbereich auftreten.

2.4.2 Elektronen-Spektrum

Das Elektronenspektrum von 20 weist bei 224 nm ein Maximum hoher Intensität auf (ε = 14000). Ein wesentlich schwächeres Maximum liegt bei 285 nm (ε = 2250). Für 21 werden Maxima bei 233 nm (ε = 11700) und bei 267 nm (ε = 8400) angegeben. Für 22 gelten sehr ähnliche Werte [74]. Wir fertigten ein UV-Spektrum von Cucurbitacin I (22) (Firma Roth) an und fanden Maxima bei 228 nm (ε = 13000) und bei 265 nm (ε = 8000). Das Chromophor des kurzwelligen Maximums in 21 und 22 ist die zur 22-Ketogruppe konjugierte Doppelbindung der Seitenkette.

Da die isolierte Hauptverbindung 20 ein sehr ähnliches Maximum aufweist, war eine ungesättigte Seitenkette als Strukturbestandteil möglich. Ein Maximum von 285 nm tritt bei Cucurbitacinen nicht auf.

2.4.3 Massenspektren

Glykoside sind als schwer flüchtige Verbindungen normalerweise nicht unzersetzt verdampfbar, mit der Konsequenz, daß schwere Fragmente, und insbesondere das Molekülion nicht oder nur in sehr geringer Intensität bei der EI-Massenspektroskopie (Elektronenstoßionisation) auftreten [75].

Auch 20 "verdampft" bei der Aufnahme eines EI-MS erst bei sehr hohen

Temperaturen. Das Ion höchster Masse erscheint bei m/z 482 mit einer sehr geringen Intensität (unter 1 %). Die Vermutung, daß es sich dabei um ein Fragment oder das M^+ eines thermischen Zersetzungsproduktes handelt, bestätigte sich bei der Aufnahme eines FAB- und eines DCI-MS.

Die "direct chemical ionisation" (= DCI) oder das "fast atom bombardement" (= FAB) - Verfahren, bei denen die Substanz nicht verdampft werden muß, sind geeignete massenspektroskopische Methoden zur Ermittlung des Molekulargewichtes bei Glykosiden.

Bei der DCI wird das Reaktandgas (z.B. NH_3-Moleküle), durch Elektronen-Beschuß ionisiert. Das so gebildete Plasma reagiert mit der Untersuchungssubstanz, die auf einen dünnen Draht aufgebracht, in die Quelle eingeführt ist. Die Ionisation findet vorwiegend durch Anlagerung von Plasma-Ionen (NH_4^+) oder durch H^+-Übertragungen statt [75].

Im Fall von 20 wird bei der Ionisation in NH_3-Gasen das Ion höchster Masse bei m/z 722 $(704 + NH_4)^+$ gefunden.

Das Prinzip des FAB besteht darin, daß auf eine dünne Probenschicht in der Ionenquelle schnelle neutrale Atome (Ar, Xe) geschossen werden [75]. Diese schnellen neutralen Atome werden durch eine sogenannte Atomkanone erzeugt, in der zunächst geladene Ionen entstehen, nach Beschleunigung in eine Stoßkammer gelenkt werden und dort auf neutrale Atome treffen. Dadurch findet ein Ladungsaustausch ohne großen kinetischen Energieverlust statt.

Da die Probe in eine Matrix aus Glycerin oder ein ähnlich hochsiedendes Lösungsmittel eingebettet wird, entstehen beim Auftreffen der schnellen Edelgas-Atome nicht nur $\left[(M + H)^+\right]$- Ionen , sondern auch Clasterionen mit der Matrix $\left[(M + \text{Glycerin})^+\right]$- Ionen .

Ein FAB (Xenon)-Spektrum von 20 zeigt Ionen der Masse 705 an und bestätigte damit das durch DCI-MS ermittelte Molekulargewicht von 704.

Das Fehlen eines M^+ in EI-Massenspektren ist für Cucurbitacine charakteristisch, die eine Seitenkette der Struktur tragen, wie bei 21 und 22 angegeben. Die Abspaltung von Essigsäure $(M - 60)^+$ oder H_2O $(M - 18)^+$ erfolgt so leicht, daß nur Molekülionen von Thermolyseprodukten auftreten [76].

Demnach stellt m/z 482, als Ion höchster Masse im EI-MS von 20 erscheinend, das Molekülion des Aglykons nach thermischem Zerfall und Verlust von Essigsäure (= 60 Masseneinheiten) dar.

Die Bildung der wesentlichen Fragmente von 20 im EI-MS gibt Abbildung 2 wieder.

Abb. 2: EI-MS von 20

Fragmente, die in analoger Weise wie bei 21 und 22 entstanden sein konnten, waren in den Massen 386 und 369 zu sehen. Diese werden gebildet im Zuge einer teilweisen Abspaltung der ungesättigten Seitenkette und anschließendem Verlust der Hydroxylgruppe an C-16.
Einer massenspektroskopischen Studie über Cucurbitacine [76] war zu entnehmen, daß ein Fragment der Masse 96 bzw. der Verlust von 96 Masseneinheiten typisch für Cucurbitacine mit ungesättigter Seitenkette ist.
Die Zusammensetzung des Peaks bei m/z 96 wurde von Audier und Das u.a. für Cucurbitacin D (5), E (21) und I (22) durch Hochauflösung mit C_6H_8O bestimmt. Folgender Bildungsmechanismus wird vorgeschlagen [76]:

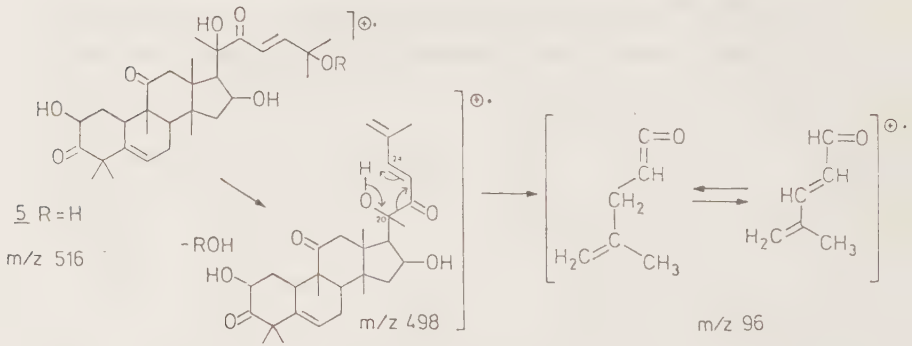


Abb. 3: Entstehen des Fragmentes m/z 96 bei 5

Verbleibt die positive Ladung nicht auf dem Seitenkettenfragment, wird das entsprechende $(M-H_2O-96)^+$ -Ion im Massenspektrum registriert. Erfolgt keine H-Übertragung von der C-20-OH-Funktion auf C-24, so findet unter Verlust von 95 Masseneinheiten und anschließender Eliminierung von Wasser folgende Fragmentierung statt [76]:

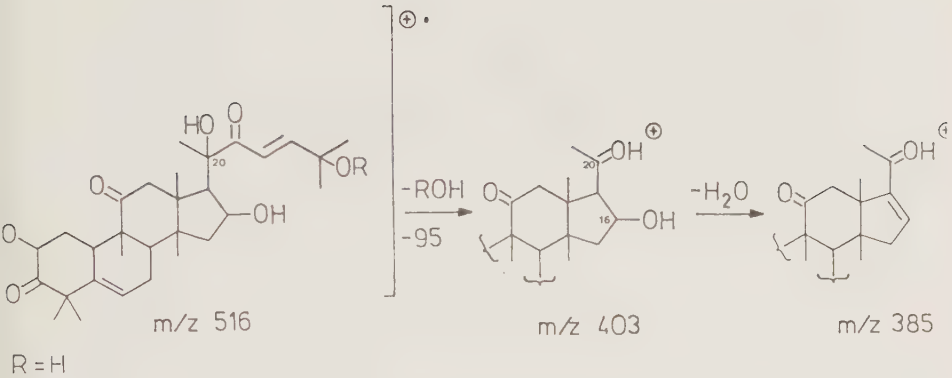
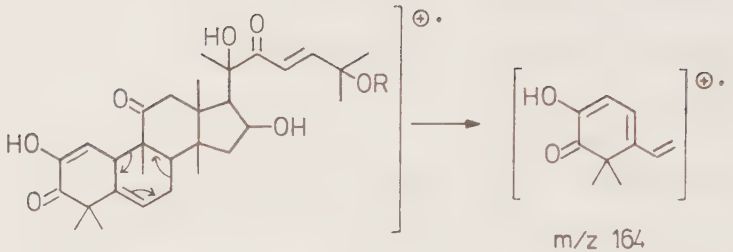


Abb. 4: Entstehen der Fragmente m/z 403 und m/z 385 bei 5

Im EI-MS von 20 tritt ein Fragment bei m/z 96 in geringer Intensität auf; auch Ionen der Masse m/z 386 und 369 werden registriert, wodurch eine Abspaltung von 96 bzw. von 95 Masseneinheiten und anschließendem Wasserverlust aus m/z 482 nach einem Bildungsmechanismus, wie in den Abbildungen 4 und 5 dargestellt, wahrscheinlich gemacht wird (siehe auch Abschnitt 2.7.1.1, Abb. 9, S. 68).

Andere für Cucurbitacine typische Fragmente, die dem Ring A oder B entstammen, waren für 20 nicht zuzuordnen. Der Zerfall von Cucurbitacinen mit ungesättigtem Ring A z.B. wie in 21 und 22 wird nicht vorwiegend durch die Abspaltung der Seitenkette bestimmt. Ein Retro-Diels-Alder-Zerfall dominiert die Fragmentierung, die zu einer typischen Masse bei m/z 164 führt. Die Zusammensetzung wurde mit $C_{10}H_{12}O_2$ durch Hochauflösung ermittelt [76].



21 R = Ac

Abb. 5: Entstehen des Fragmentes m/z 164 bei 21

Base-Peak von 20 stellt m/z 43 im unteren Massenbereich dar, was darauf zurückzuführen ist, daß die Acetatgruppe einer tertiären Hydroxylfunktion besonders leicht abgespalten wird. Ein Artikel über massenspektroskopische Analyse von Cucurbitacinen aus Cucumis sativus - Samen [77] tabelliert auch Fragmente des unteren Massenbereiches. Daraus war zu entnehmen, daß m/z 43 auch bei Cucurbitacin E (21) als Base-Peak in Erscheinung tritt.

Zusammenfassend läßt sich feststellen: EI-MS (und UV-Spektrum) legten für 20 eine Seitenketten-Struktur nahe vom Typ des Cucubitacin E (21).

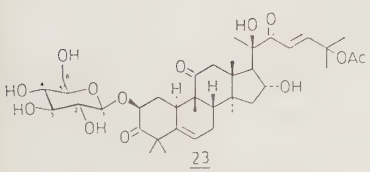
2.4.4 ^{13}C-NMR*-Spektren

Es gibt mehrere ^{13}C-NMR-Studien über Cucurbitacine und Cucurbitacin-Glykoside [78-81], bei denen Zuordnungen und wahrscheinliche Zuordnungen getroffen werden. Die Autoren Bull, Chalmers und Coleman [79]

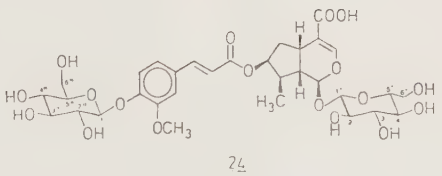
* ^{13}C-NMR wird im Text auch vereinfacht als ^{13}C bezeichnet, ^{1}H-NMR entsprechend als ^{1}H

berichten über Assoziationserscheinungen bei höheren Konzentrationen, die durch die Polariät der hoch oxidierten Cucurbitacine bedingt sind. Lanthaniden-induzierte Shifts waren als Zuordnungshilfe wenig brauchbar, da die Strukturen der Cucurbitacine durch die vielen Funktionen zu kompliziert waren, um eindeutige Aussagen zuzulassen. Die Autoren ordneten C-Atome aufgrund ihrer Resonanzlage zu und identifizierten die C-Typen mit Hilfe ihrer Multiplizitäten in "single frequenz off resonance decoupling" - (=sford) Spektren; weiterhin wurden strukturelle Modifikationen vorgenommen und die entsprechenden Shift-Antworten für die Zuordnung der betroffenen Kohlenstoffatome herangezogen. Dennoch traten Signale auf, deren Zuordnung unsicher blieb. Dies zeigt sich auch daran, daß verschiedene Autoren bestimmte ^{13}C-Resonanzen jeweils umgekehrt zuordnen. Das betrifft vor allem die C-Atome 8/10, 13/14 und CH_3-Gruppen 18/19 [78-81]. Die ^{13}C-Resonanzlagen von Cucurbitacin E (21) in verschiedenen Publikationen sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

^{13}C-Daten für die β-Glucose-Anteile von Arvenin I (= Cucurbitacin B-2-O-β-D-glucosid) (23) aus Anagallis arvensis [81] und für Periclymenosidic acid (24) aus Lonicera coerulea [82] sind in Tabelle 2 angegeben.



23



24

Tabelle 1: ^{13}C-NMR-Daten von Cucurbitacin E (21)

Literatur	78)	79)	80)	
C-Atom	δ[ppm]/$CDCl_3$	δ[ppm]/$CDCl_3$	δ[ppm] /C_5D_5N	
1	115.2	114.9	115.8	18.5
2	144.8	144.8	147.2	20.2
3	198.9	198.7	198.7	20.5
4	47.7	47.7	48.6	20.7
5	136.6	137.1	137.9	CH_3- 21.7
6	120.6	120.9	120.6	25.4
7	23.5	23.8	24.0	26.3
8	41.6	41.9	35.3	26.6
9	48.9	48.3	48.6	28.1
10	34.6	35.0	42.3	
11	214.0	212.7	213.5	
12	48.6	49.0	49.4	
13	48.0	50.9	49.4	
14	50.4	49.0	51.0	
15	45.3	45.8	46.6	
16	70.8	71.5	70.9	
17	58.0	58.6	59.7	
18	19.8	18.5		
19	17.6	20.3		
20	78.5	78.5	79.7	
21	23.8	24.2		
22	203.1	202.6	204.1	
23	120.6	120.7	122.6	
24	151.3	151.9	150.1	
25	79.6	79.4	79.7	
26	26.0	26.5		
27	26.0	26.2		
28	19.7	20.3		
29	27.8	28.1		
30	20.0	19.9		
$\underline{C}H_3$-CO	21.7			
CH_3-$\underline{C}O$	171.6		169.7	

Tabelle 2: ^{13}C-NMR-Daten der β-Glucose-Anteile von 23 [81] und 24 [82]

C-Atom	23 δ[ppm]/C_5D_5N	24 δ[ppm]/CD_3OD
1'	104.0	100.27
2'	75.6	74.83
3'	78.2	78.06
4'	71.4	71.68
5'	78.2	78.39
6'	62.6	62.88
1"	-	102.23
2"	-	74.83
3"	-	77.86
4"	-	71.33
5"	-	78.29
6"	-	62.55

Die bei Verbindung 24 aufgeführten Zuckerdaten des phenolisch gebundenen Glucose-Anteils (β-Gluc") sollen im Vergleich mit den Glucose-Daten (β-Gluc') bei Verbindung 23 bzw. 24 demonstrieren, daß in den ^{13}C-NMR-Spektren der Lösungsmittelwechsel von Pyridin auf Methanol keine nennenswerten Shifts der Zucker-C-Atome hervorruft. Auch die Veretherung mit einer phenolischen OH-Funktion einerseits, und einer sekundären OH-Gruppe andererseits, läßt die Resonanzlage der Glucose-Atome relativ unbeeinflußt.

Es wurden mehrere ^{13}C-NMR-Spektren von 20 aufgenommen; durch Lösungsmittelwechsel sollten eventuell verdeckte C-Signale und Lösungsmittel-Shifts beobachtet werden. Es stellte sich heraus, daß der Einfluß des Lösungsmittels auf die Resonanzlage der Signale nur gering ist, sich

jedoch stark auf die Güte der Spektren auswirkt.

Ein Spektrum in $CDCl_3$ sollte die Korrelierbarkeit der Daten im Vergleich mit Cucurbitacin E (21) gewährleisten. Manche Signale des $CDCl_3$-Spektrums von 20 zeigen starke Verbreiterungen und sind von sehr geringer Intensität. Ein J-moduliertes Spinecho-Experiment erleichterte das Erkennen von übereinanderliegenden Signalen. Dieses Verfahren erlaubt die Unterscheidung von CH_3- und CH-Gruppen, die auf der Frequenzachse nach unten aufgezeichnet werden, von CH_2-Funktionen und quartären C-Atomen, deren Resonanzen nach oben aufgezeichnet erscheinen (Tabelle 3). Grundlage hierbei ist die sogenannte Spinecho-Pulssequenz: nach einem 90° - Anregungsimpuls erfolgt ein 180°-Impuls, der die Vektoren der transversalen Magnetisierung invertiert. Zwischen den beiden Impulsen und zwischen 180°-Impuls und FID (= free induction decay) liegt jeweils eine Zeitperiode τ. Der ^1H-Entkoppler ist während der zweiten τ-Periode ausgeschaltet, wodurch die Magnetisierung infolge der ^{13}C-^1H-Kopplungen moduliert wird.

Wählt man $\tau = 1/J$ (τ= 8 ms bei $^1J_{^{13}C,\,^1H}$ ca. = 125 Hz), dann erhält man für quartäre C- und CH_2-Gruppen positive, und für CH- und CH_3-Funktionen negative Signale [75].

Eine Messung von 20 in d_5-Pyridin zeigt bis auf wenige Verbreiterungen scharfe Signale, so daß ein "off-resonance"-Spektrum aufgenommen werden konnte (Tabelle 3). Die resultierenden Multiplizitäten der Kohlenstoffatome ergänzten die auf Grund des J-modulierten Spinecho-Spektrums von 20 in $CDCl_3$ gewonnenen Erkenntnisse.

Im Gegensatz zum Routine-^{13}C-NMR-Spektrum, dem ^1H-Breitband-entkoppelten Spektrum (Proton Noise Decoupling), bei dem ein Frequenzband eingestrahlt

Tabelle 3: ^{13}C-NMR-Experimente mit 20

Feldstärke	100,41 MHz	22,50 MHz	22,50 MHz	20,10 MHz
Art des Experiments	Breitband-Entkopplung	Breitband-Entkopplung	off resonance	J-moduliertes Spinecho
Lösungsmittel	CD_3OD	CD_3OD	CD_5N	$CDCl_3$
	δ [ppm]	δ [ppm]	δ [ppm]	δ [ppm]
	11.6	11.6	11.8 (q)	11.5 (CH_3)
	19.9	19.9 (breit)	19.8	
	19.8		(breit)	20.0 (breit, CH_3+CH_2)
	20.4	20.4	20.4	
	21.8	21.9	21.7 *	22.8 (CH_3)
	24.5		24.3 *	
	25.0	25.1 (breit)	25.4	25.0 (breit, CH_3+CH_2)
	26.5	26.5	26.3	26.6 (CH_3)
	26.6	26.6	26.6	26.8 (CH_3)
	29.3	29.3	29.3 (q)	30.0 (CH_3)
	43.3	43.7	43.0 (d)	
	46.1	46.5	46.1 (t)	
	49.3	49.3	49.2 (s)	48.6 (C/CH_2)
	50.9	50.9	50.6 (s)	51.0 (C/CH_2)
	51.6	51.6 (breit)	51.0 (s)	51.8 (breit, C/CH_2)
	51.7		51.1 (t)	
	59.6	59.6	59.9 (d)	
	62.0	62.0	62.1 (t)	62.0 (C/CH_2)
	70.8	70.8	70.7 (d)	
	71.4	71.4	71.1 (d)	
	74.3	74.3	74.8 (d)	
	78.3		78.3 (d)	
	78.7	78.8 (breit)	78.7 (d)	79,8 (C, sehr intens.)
	80.1	79.9	79.6 (s)	
	80.6	80.6	79.8 (s)	
	104.5	104.5	105.8 (d)	103.5 (CH)
	113.2	113.2	114.7 (d)	113.5 (CH=)
	122.2	122.2	122.2 (d)	121.5 (CH=)
	124.4	124.4	124.2 (s)	124.5 (C=)
	129.5	129.5	129.6 (s)	129.5 (C=)
	130.9	130.9	131.0 (s)	130.6 (C=)
	144.0	144.0	144.3 (s)	144.0 (C=)
	144.4	144.4	145.7 (s)	144.6 (C=)
	151.4	151.4	151.4 (d)	152.6 (CH=)
	171.4	171.4	169.7 (s)	171.0 (C)
	204.7	204.7	204.1 (s)	204.6 (C)
	216.1	216.1	213.8 (s)	216.4 (C)

*) Durch Überlagerung der Signale ist eine eindeutige Aussage über die Multiplizität nicht möglich.

Abkürzungen s. S. -IV-

wird, das den gesamten Protonen-Bereich erfaßt, wird beim "off-resonance"-Spektrum eine Entkopplungsfrequenz gewählt, die außerhalb des Resonanzbereichs der Protonen liegt. Man erhält C-Signal-Multiplizitäten, die auf direkte ^{13}C-^{1}H-Kopplungen zurückgehen. Dadurch wird eine Unterscheidung von primären (CH_3/Quartett), sekundären (CH_2/Triplett), tertiären (CH/Dublett) und quartären (C/Singulett) C-Atomen möglich [75].

Erst ein ^{13}C-NMR-Spektrum von 20 in d_4-Methanol (Tabelle 3) mit einem 400 MHz-Gerät zeigt alle C-Atome und separiert Signale, die bei Spektrometern geringerer Betriebsfrequenz zusammenfallen und dann verbreitert oder sehr intensiv erscheinen (Tabelle 3).

Tabelle 3 faßt die Daten der oben erwähnten ^{13}C-NMR-Experimente zusammen; es werden jeweils nur die deutlich sichtbaren Signale angegeben.

2.4.5 Ableitung eines Strukturvorschlags

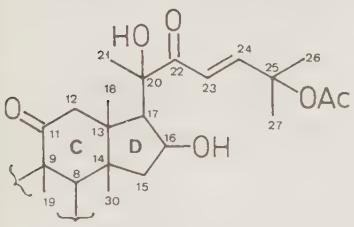
Es wurde deutlich, daß 20 Strukturbestandteile enthält, die typisch für Cucurbitacin E (21) sind. Eine sehr gute Übereinstimmung der ^{13}C-Resonanzlagen ergibt sich im Bereich der Ringe C, D und der ungesättigten Seitenkette (Strukturbestandteil 25).

Tab. 4 (S. 33) stellt die Signale von 20 denjenigen von 21 gegenüber; in Kolonne sind die Resonanzen aufgeführt, für die eine unmittelbare Korrelation mit 21 möglich ist.

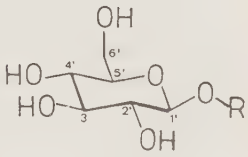
Auch die Signallagen des Zuckeranteils 26 in 20 stimmen gut mit den in Tab. 2 (S. 33) aufgeführten Glucose-Daten überein und zeigen eine β-glykosi-

dische Bindung an [83].

Folgende Strukturbestandteile sollten hiermit anwesend sein:



25



26

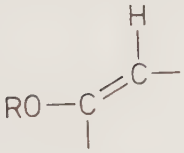
Viele für Cucurbitacine typische ^{13}C-Signallagen können jedoch nicht korreliert werden. Dies betrifft die Resonanzen für die C-Atome der Ringe A und B. So fehlen z.B. die Signale, die eine Doppelbindung zwischen den C-Atomen 5 und 6 anzeigen, die bei allen Cucurbitacinen vorhanden ist. Auch ein Signal bei etwa 34 ppm, typisch für das unsubstituierte C-Atom 10, ein charakteristisches Merkmal der Cucurbitacin-Substanzklasse, tritt in den ^{13}C-NMR-Spektren von 20 nicht auf. Ein ganz wesentlicher Befund war auch, daß 20 ein C-Atom weniger aufweist, als dies bei einem Cucurbitacin-Glucosid der Fall ist.
Die nicht mit Cucurbitacinen übereinstimmenden Resonanzen von 20 sind in Tabelle 4 ebenfalls aufgeführt. Von den 10 Signalen zwischen 11 und 30 ppm, konnten einschließlich der CO-$\underline{CH_3}$-Funktion 6 als CH_3-Gruppen mit 21 korreliert werden, 4 dagegen nicht.
Beim J-modulierten Spinecho-Experiment (Tabelle 3, S. 35) waren inklusiv der acetylischen CH_3-Gruppe deutlich mindestens 7 Signale bei hohem Feld als CH_3-Gruppen (nach unten) aufgezeichnet worden. Eine achte CH_3-Funktion war möglich, wenn das breite Signal bei 20.0 ppm zusammengefallene Resonanzen darstellte.

Tabelle 4: Gegenüberstellung der ^{13}C-NMR-Resonanzlagen von 20 und 21

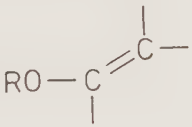
		korrelierbar	nicht korrelierbar
	21/$CDCl_3$ [78]	20/CD_3OD	20/CD_3OD
C-Atom	δ [ppm]	δ [ppm]	δ [ppm]
1	115.2		144.4
2	144.8		144.0
3	198.9		130.9
4	47.7		129.5
5	136.6		124.4
6	120.6		113.2
7	23.5		29.3
8	41.6	43.3	24.5
9	48.9	51.7	19.9
10	34.6		11.6
11	214.0	216.1	
12	48.6	51.6	
13	48.0	49.3	
14	50.4 *	50.9 *	
15	45.3	46.1	
16	70.8	71.4	
17	58.0	59.6	
18	19.8	20.4	
19	17.6		
20	78.5	80.1	
21	23.8	25.0	
22	203.1	204.7	
23	120.6	122.2	
24	151.3	151.4	
25	79.6	80.6	
26	26.0	26.5	
27	26.0	26.6 *	
28	19.7		
29	27.8		
30	20.0	19.8	
CH_3-COO	171.6	171.4	
CH_3-CO	21.7	21.8	

* Zuordnung gegebenenfalls umgekehrt

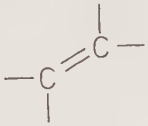
Folglich war von den nicht korrelierbaren 4 hochfeldigen C-Atomen mindestens noch eines eine CH_3-Funktion und die übrigen drei Methylengruppen; oder, es handelte sich um zwei CH_3-Gruppen und zwei CH_2-Gruppen, was die wahrscheinlichere Alternative war, da zwei Signale nach oben aufgezeichnet erschienen, wenn auch mit sehr geringer Intensität. Die nicht zugeordneten C-Atome bei tiefem Feld sind mit Ausnahme eines C-Atoms [δ=113.2 ppm (Dublett)] quartäre Kohlenstoffatome, da sie im "off-resonance"-Spektrum als Singuletts erscheinen. Die Verschiebungen 144.0 und 144.4 sprachen für =C-OH-Substitution. Nahm man nun zwei enolische Teilstrukturen an, waren folgende Strukturbestandteile in den Ringen A und B zu verteilen:



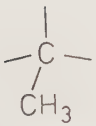
27



28



29

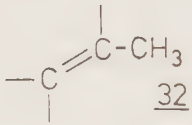


30

31

31

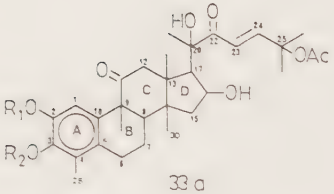
Das sehr hochfeldige Signal bei 11.6 ppm wies auf eine CH_3-Gruppe an einem sp^2-hybridisierten C-Atom, und damit auf Teilstruktur 32 hin.



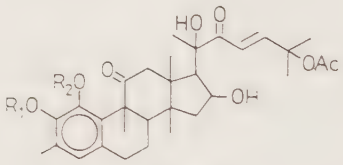
32

Die Beobachtung, daß sich im Gegensatz zum Glucosid das Aglykon an der Luft relativ schnell oxidiert (erkennbar an der Gelbfärbung), konnte bedeuten, daß zwei "enolische" C-Atome benachbart sind und eines davon die Glucose trägt. Nach enzymatischer Spaltung entsteht eine oxidationsempfindliche Diol- bzw. Redukton-Gruppierung. Diese Überlegungen, die Beachtung der oben geforderten Teilstrukturen 25 - 32 und der Befund, daß 20 ein C-Atom weniger enthält als Cucurbitacin-Glucoside, ließen uns folgende Arbeitshypothesen formulieren:

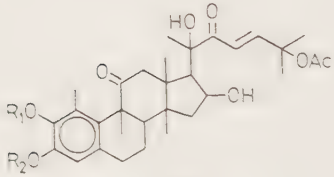
entweder R_1=ß-Gluc, R_2=H
oder R_1=H, R_2=ß-Gluc



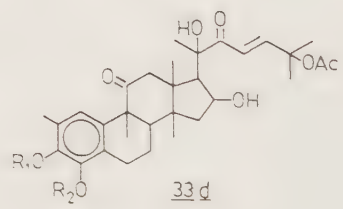
33 a



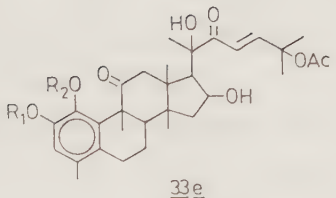
33 b



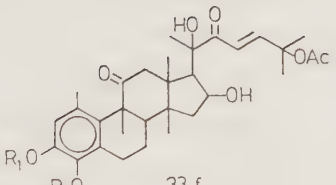
33 c



33 d



33 e



33 f

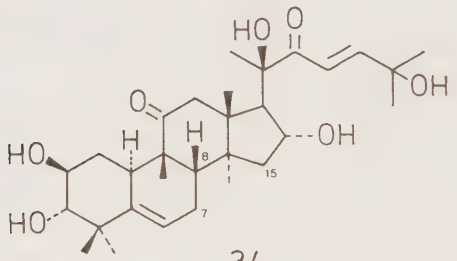
Da Cucurbitacine nicht an C-1, sondern immer an C-3 und meist auch an C-2 eine Sauerstoff-Funktion tragen und C-4 mit Methylfunktionen substituiert ist, war 33 a die Arbeitshypothese, die mit einer Cucurbitacin-ähnlichen Struktur am besten in Einklang zu bringen war. Aus biogenetischen Gründen forderten wir auch eine Carbonyl-Funktion an C-11 und eine CH_3-Gruppe an C-9 (Teilstruktur 25), obwohl die ^{13}C-NMR-Daten auch eine C-12-Keto-Gruppe und eine CH_3-Funktion, fixiert an C-8, zuließen.

Die Beweisführung für Teilstruktur 25, für die alternativen Arbeitshypothesen 33 a - 33 f bzw. den sicheren Ausschluß von 33 b - 33 f und für die Position der β-Glucose ist Gegenstand der weiteren Abschnitte dieser Arbeit (siehe 2.5, 2.6 und 2.7).

2.4.6 ^{1}H-NMR-Spektren

Nur relativ wenige ^{1}H-NMR-Daten über Cucurbitacine sind in der Literatur beschrieben und es gelingt nur eine teilweise Zuordnung der ^{1}H-Signale. Tabelle 6 (S. 44) führt Resonanzlagen der Protonen in Cucurbitacin E (21)

auf, wobei jedoch noch Unsicherheiten bezüglich der Richtigkeit in der Zuordnung von CH_3-21 und CH_3-19 bestehen [68,78,84]. Die chemischen Verschiebungen für die Protonen 7_A, 7_B, 8, 15_A und 15_B werden nicht angegeben. Eine Veröffentlichung über Cucurbitacine in Elaeocarpus dolichostylus [85] ordnet die Resonanzlagen von vier der oben genannten "fehlenden" Protonen für Cucurbitacin F (34) folgendermaßen zu (Tabelle 5):



34

Tabelle 5: Resonanzlagen der Protonen 7_A, 7_B, 8 und 15_B in 34 (d_5-Pyridin;360 MHz)

Proton	δ [ppm]
15_B	1.71 (d,J = 12.8 Hz)
7_A	1.90 (m)
8	1.93 (d,J = 8,2 Hz)
7_B	2.33 (dm)

Die Resonanzlage von H-15_A wird nicht aufgeführt, da vermutlich dessen Signal durch eine der acht Methylgruppen verdeckt wird.

Wie auch schon beim ^{13}C-NMR-Spektrum weist das ^{1}H-NMR-Spektrum von 20 in $CDCl_3$ - Lösung teilweise recht starke Signalverbreiterungen auf, die dann bei Messung in d_4-Methanol nicht mehr auftreten. Die Güte der Protonenspektren ist außerdem stark konzentrationsabhängig. Die besten Ergebnisse lassen sich im Größenbereich von etwa 5 - 7 mg/ml Lösungsmittel erzielen.

Tabelle 6 listet die Protonenresonanzen von 20, gemessen in d_4-Methanol sowie $CDCl_3$ auf, und stellt einige mit Cucurbitacin E (21) unmittelbar korrelierbare Protonenresonanzen gegenüber.

Es bestätigten sich die Strukturähnlichkeiten im Bereich der Ringe C, D und der ungesättigten Seitenkette, so daß die Partialstruktur 25 weiter abgesichert wird. Sowohl die CH_3-Gruppen an C-25, als auch die trans - Doppelbindung zwischen C-23 und C-24 konnten zugeordnet werden. Die Anordnung der Protonen H-16 und -17 und der Methylgruppen 18 (an C-13) und 30 (an C-14) entspricht nach Lage und Kopplungsmuster den Signalen von 21. Die Anwesenheit eines geminalen Protonenpaares, das von quartären C-Atomen flankiert ist, ergibt sich durch ein AB-System zwischen 2.6 und 2.9 ppm, mit einer Kopplungskonstante von 15 Hz. Dies sprach ebenfalls dafür, daß Ring C eine Anordnung hat, wie sie bei Cucurbitacinen an C-12 typisch ist.

Wie nach den ^{13}C-Daten aufgrund der zahlreichen quartären C-Atome zu erwarten war, konnten Korrelationen im Bereich der Ringe A (und B) nicht getroffen werden. 20 zeigt eine CH_3-Gruppe weniger als 21, andererseits fehlen Signale, wie sie für eine geminale Dimethylanordnung an C-4 typisch sind (CH_3-28/CH_3-29).

Tabelle 6: Gegenüberstellung der ^{1}H-NMR-Resonanzlagen von 20 und 21

Proton CH_3-	20 /MeOH-d_4 δ[ppm]	20 /$CDCl_3$ δ[ppm]	21 /$CDCl_3$ δ[ppm]
H-1	6.67 (s)	6.76 (s)	5.90 (d,J=3 Hz)
H-6_A	2.60-2.67 (m)		5.77 (m)
H-6_B	2.79-2.93 (m)		
H-7_A	1.92-1.96 (m)		
H-7_B	2.19-2.29 (m)		
H-8	2.10 (d,J=5 Hz)		
H-10			3.51 (m)
H-12_A	2.61 (d,J=15 Hz)	2.70 (d,J=15 Hz)	2.66 (d,J=15 Hz)
H-12_B	2.88 (d,J=15 Hz)	2.85 (d,J=15 Hz)	3.20 (d,J=15 Hz)
H-15_A *			
H-15_B	1.92-1.96 (m)		
H-16	4.53 (bt)	4.53 (bt)	4.39 (bt)
H-17	2.50 (d,J=7 Hz)	2.45 (d,J=7 Hz)	2.49 (d,J=7 Hz)
H-23	6.80 (d,J=16 Hz)	6.45 (d,J=16 Hz)	6.54 (d,J=15 Hz)
H-24	6.97 (d,J=16 Hz)	7.02 (d,J=16 Hz)	7.03 (d,J=15 Hz)
CH_3-18	0.90	1.00	0.97
CH_3-19	1.30	1.35 **	1.34**
CH_3-21	1.37	1.41 **	1.42**
CH_3-26	1.54	1.50	1.55
CH_3-27	1.54	1.53	1.55
CH_3-28	2.07	2.10	1.38
CH_3-29			1.25
CH_3-30	0.99	1.04	1.02
CH_3-CO	1.97	1.99	2.01

* Resonanzlage durch Methylsignal verdeckt
** Zuordnung gegebenenfalls umgekehrt

Ein Signal von 3 Protonen (Singulett) erscheint bei sehr tiefem Feld. Die Resonanzlage von 2.07 ppm sprach für eine vinylische Methylgruppe, was in Übereinstimmung mit Teilstruktur 32 bzw. den Arbeitshypothesen 33 a - 33 f stand.

Auf einen aromatischen Charakter von 20 deutete auch die Resonanzlage eines Protons bei 6.76 hin (Singulett).

Dies stimmte mit den ^{13}C-Daten überein, die im sp^2-hybridisierten Verschiebungsbereich (außer C-23 und C-24) nur ein Methin-C-Atom im off-resonance-Experiment nachgewiesen hatten; die übrigen sp^2-hybridisierten C-Atome sind quartär und erscheinen als Singuletts.

Das für Cucurbitacine typische Resonanzsignal für H-6 (δ = 5.77 ppm für 21 [78]), war nicht vorhanden. Dies ergänzte die ^{13}C-NMR-Befunde, wonach eine Doppelbindung zwischen C-5 und C-6 nicht mit 21 zu korrelieren war.

Das Kopplungsmuster im Bereich 2.6 - 2.9 ppm ist bei 20 wesentlich komplizierter als bei Cucurbitacin E (21), da hier außer den beiden H-12 zwei weitere Protonen als Multipletts aufspalten. Nach der Lage dieser Signale konnten dies die benzylischen Protonen (an C-6) sein. Die Protonen 7_A, 7_B, 8 und 15_B konnten wir aufgrund der Daten in Tabelle 5 zuordnen (S. 42).

Die beobachteten ^{1}H-NMR-Resonanzlagen des Zuckerteils stehen in guter Korrelation zu Literatur-Daten für β-Glucoside [82,86] und sind in Tabelle 7 aufgeführt (S. 46).

Tabelle 7: ^{1}H-NMR-Resonanzlagen des β-Glucose-Anteils von 20 (CD_3OD; 400 MHz)

Proton	δ [ppm]
1'	4.58 (d, J = 7.5 Hz)
2', 3', 4', 5'	3.32 - 3.55 (m)
6_A'	3.83 (dd, J_1 = 12, J_2 = 4 Hz)
6_B'	3.97 (dd, J_1 = 12, J_2 = 2,5 Hz)

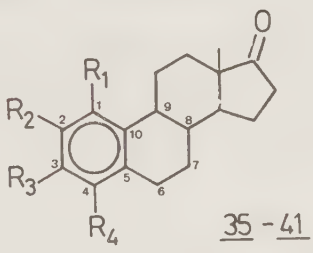
2.5 Inkrementberechnungen zur Arbeitshypothese 33 a

Das Vorliegen eines Brenzcatechin-Systems würde die leichte Oxidierbarkeit des Aglykons von 20 erklären. ^{13}C-Daten eines Aromaten oder Tetralins mit einem 33 a entsprechendem Substitutionsmuster waren in der Literatur nicht zu finden. Daher haben wir als Vergleichsverbindungen zunächst Östratrien-Derivate gewählt und durch Inkrementberechnung die zu erwartenden Resonanzlagen für Ring A in 33 a bestimmt und mit den gemessenen Daten von 20 verglichen.

Ausgehend von den ^{13}C-NMR-Daten des unsubstituierten Östra-1,3,5(10)-trien-17-on (35) wurden die Shifts der C-Atome nach der Einführung verschiedener Substituenten berechnet. Zunächst wurde die Anwendbarkeit der Inkremente, die Pretsch, Clerk, Seibl und Simon [87] für die Substitution von Benzol angeben, überprüft: Die Östra-1,3,5(10)-trien-17-on-Derivate 36 - 41 wurden berechnet und mit Literaturdaten der

gemessenen Verbindungen verglichen, soweit diese zur Verfügung standen. Die Ergebnisse sind Tabelle 8 zu entnehmen.

	R_1	R_2	R_3	R_4	Literatur
35	H	H	H	H	88)
36	H	H	OH	H	88)
37	H	F	OH	H	89)
38	H	OH	OH	H	-
39	H	H	H	CH_3	90)
40	H	OH	OH	CH_3	-
41	H	H	OCH_3	H	88)



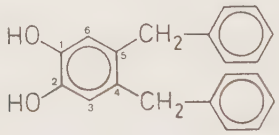
35 - 41

Tabelle 8: ^{13}C-NMR-Resonanzlagen der Östra-1,3,5(10)-trien-Derivate 35 - 41 im Bereich des aromatischen Ringes A

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-9	C-10
	δ[ppm]	δ[ppm]	δ[ppm]	δ[ppm]	δ[ppm]	δ[ppm]	δ[ppm]	δ[ppm]
35 gemessen	126.3	126.7	126.7	129.9	137.5	30.0	45.4	141.1
36 berechnet	127.7	114.0	153.6	117.2	138.9			133.8
36 gemessen	126.9	113.5	155.8	115.9	138.2	30.2	45.0	131.9
37 berechnet	112.6.	148.6	141.5	116.8	133.8			132.8
37 gemessen	112.8	149.7	142.3	117.5	130.9	28.4	43.4	132.2
38 berechnet	114.2	140.4	143.1	117.3	130.9			133.3
39 berechnet	123.2	126.7	127.3	139.2	138.1			141.1
39 gemessen	123.2	125.2	127.3	135.0	136.3	27.4	44.5	140.0
40 berechnet	111.1	140.4	143.7	126.6	131.5			133.3
41 berechnet	127.2	112.0	156.9	115.2	138.4			133.0
41 gemessen	127.3	112.5	158.9	114.7	138.4	30.0	45.0	133.2

Wie der Vergleich der berechneten und tatsächlich gemessenen Resonanzlagen der C-Atome im Ring A bei Verbindung 36, 37 und 41 zeigt, stimmen die Daten gut überein. Abweichungen liegen im Größenbereich von etwa 1 bis maximal 3 ppm.

Eine Überprüfung der berechneten Daten für Verbindung 38 konnte mit Hilfe des substituierten Brenzcatechin-Derivates 42 vorgenommen werden [91,92]:



42

$\delta_{C-1} = \delta_{C-2} = 143.5$ ppm

$\delta_{C-3} = \delta_{C-6} = 117.9$ ppm

$\delta_{C-4} = \delta_{C-5} = 130.8$ ppm

Bei den Verbindungen 38 und 42 fällt auf, daß die Resonanzlagen der C-Atome 3,4 und 5 in 38 sehr gut mit denen der C-Atome 1/2, 3/6 und 4/5 in 42 korrelierbar sind. Die Abweichungen der C-Atome 1,2 und 10 in 38 im Vergleich zu 1/2, 3/6 und 4/5 in 42, sind auf den sterischen Einfluß der Ringe B und C im Steroidgerüst zurückzuführen.

Die Abweichung von berechnetem zu gemessenem Wert des C-Atoms 4 in 39 ist größer als die der übrigen C-Atome. Statt eines Tieffeld-Shifts von + 9.3 ppm als Inkrement z_1 für die Einführung einer CH_3-Gruppe [87], beträgt der Wert bei 39 nur + 5.1 ppm.

Auffallend bei 39 ist auch, daß im Fall des angulären C-5, das ebenfalls eine größere Differenz zwischen gemessener und berechneter Resonanzlage aufweist als die übrigen C-Atome, sich das Vorzeichen z_2 ändert und statt des erwarteten Tieffeld-Shifts von + 0.6 [87] ein Hochfeld-Shift von -1.2 ppm auftritt.

Diese Berechnungen zeigten, daß es möglich ist, die Inkremente für Benzol auch für Steroidgerüste heranzuziehen, wobei sich jedoch in Abhängigkeit von Substitutionsstelle und -grad die Größenordnung, und unter Umständen auch das Vorzeichen des Shifts ändern können. Unter Berücksichtigung des bei 39 gefundenen Tieffeld-Shifts von z_1 (korrigiert) = +5.1 ppm für eine C-4-Methylsubstitution, berechneten wir die Signallagen von 40.

Tabelle 9 stellt die berechneten Resonanzen für Ring A bei 40 denjenigen von 20 gegenüber, die im sp^2-hybridisierten Verschiebungsbereich auftreten und nicht mit Cucurbitacinen korrelierbar sind.

Tabelle 9: Gegenüberstellung der ^{13}C-NMR-Resonanzlagen von 40 und 20 im Ring A

	C-1 δ[ppm]	C-2 δ[ppm]	C-3 δ[ppm]	C-4 δ[ppm]	C-5 δ[ppm]	C-10 δ[ppm]
40 berechnet	111.1	140.4	143.7	126.6	131.5	133.3
20 gemessen	113.2	144.0*	144.4*	124.4	129.5*	130.9*

* Zuordnung nur vorläufig

Wie Tab. 9 zeigt, ist Arbeitshypothese 33 a für Verbindung 20 aufgrund der ^{13}C-Verschiebungen durchaus möglich, da eine gute Übereinstimmung im postulierten Aromatenbereich für das Substitutionsmuster 2,3-Dihydroxy-4-methyl-Steroid 40 besteht.

Daß zwei beinahe gleiche Resonanzen von etwa 144 ppm in 20 auftreten, kann durch die Veretherung einer der beiden phenolischen OH-Gruppen

mit der β-Glucose erklärt werden. Die Derivatisierung der Hydroxyl-Funktion bei 36 zum Methylether 41 führt z.B. zu einem Tieffeld-Shift des C-Atoms 3 um ca. + 3 ppm.

Die durchgeführten Berechnungen erlaubten keine Unterscheidung der Resonanzen von C-2 und C-3 bei 20. Auch die Position der Glucose war nicht zu bestimmen. C-5 und C-10 waren nicht eindeutig festzulegen. Entsprechend der Arbeitshypothese 33 c konnte die "aromatische" CH_3-Gruppe auch C-1 substituieren und C-4 das einzige protonentragende sp^2-hybridisierte Kohlenstoffatom im Ring A darstellen, wenn auch biogenetische Aspekte die letztere Möglichkeit unwahrscheinlich erscheinen ließen (siehe Abschnitt 2.4.5, S. 41).

Aus diesem Grund wurden NMR-spektroskopische Spezialmessungen durchgeführt, die die alternativen Strukturmöglichkeiten 33 b - f ausschließen und Teilstruktur 25 unterstützen sollten (siehe Abschnitt 2.6.1 und 2.6.2).

Im Anschluß daran erfolgte die weitere Absicherung und Beweisführung auf chemischem Wege durch Strukturmodifikationen und Derivatisierungen (siehe Abschnitt 2.7)

2.6 NMR-Spektroskopische Spezialmessungen der Verbindung 20

2.6.1 $^1H\{^1H\}$- 2D-NMR-Spektrum (COSY-P)

Die zweidimensionale NMR-Spektroskopie ist eine Sonderform der Puls-Fourier-Transform-Technik (PFT-Methode). Bei der PFT-Technik findet keine direkte Absorptionsmessung statt. Meßgröße ist der Abfall der

transversalen Magnetisierung (FID = free induction decay), der nach dem Ende des Hochfrequenz-Impulses auftritt. Der FID wird durch eine mathematische Operation, die Fourier-Transformation, aus der Zeitskala in eine Frequenzskala transformiert und als eindimensionales Spektrum aufgezeichnet. Wird die zwischen dem ersten Impuls der gewählten Impulssequenz und der Datenaufnahme liegende Evolutionszeit t_1 systematisch variiert, dann ist das Empfängersignal eine Funktion der Evolutionszeit t_1 und der Detektionszeit t_2. Die FT beinhaltet dann zwei Frequenzvariable, was die Grundlage eines zweidimensionalen Spektrums darstellt. Man unterscheidet zwischen J-aufgelösten (J-resolved) und korrelierten (correlated) 2-D-Spektren.

Ein "Homonuclear J-resolved-2 D-^{1}H-NMR"-Spektrum ermöglicht es z.B., überlappende Multipletts zu isolieren und chemische Verschiebung und Multiplizität auch solcher Protonen zu bestimmen, die in einem "eindimensionalen" ^{1}H-NMR-Spektrum überlagert werden. Beim "Homonuclear shift-correlated 2D-^{1}H-NMR-Spektrum" (=COSY-P) werden miteinander koppelnde Kerne ermittelt [75,93,94].

Von 20 wurde ein homonukleares ^{1}H-Shift korreliertes 2D-Spektrum in Methanol-d_4 aufgenommen (Abb. 6). Dabei sind auf beiden Frequenzachsen die chemischen Verschiebungen aufgetragen. Alle Kopplungen werden im Konturdiagramm als Kreuzungspunkte sichtbar.

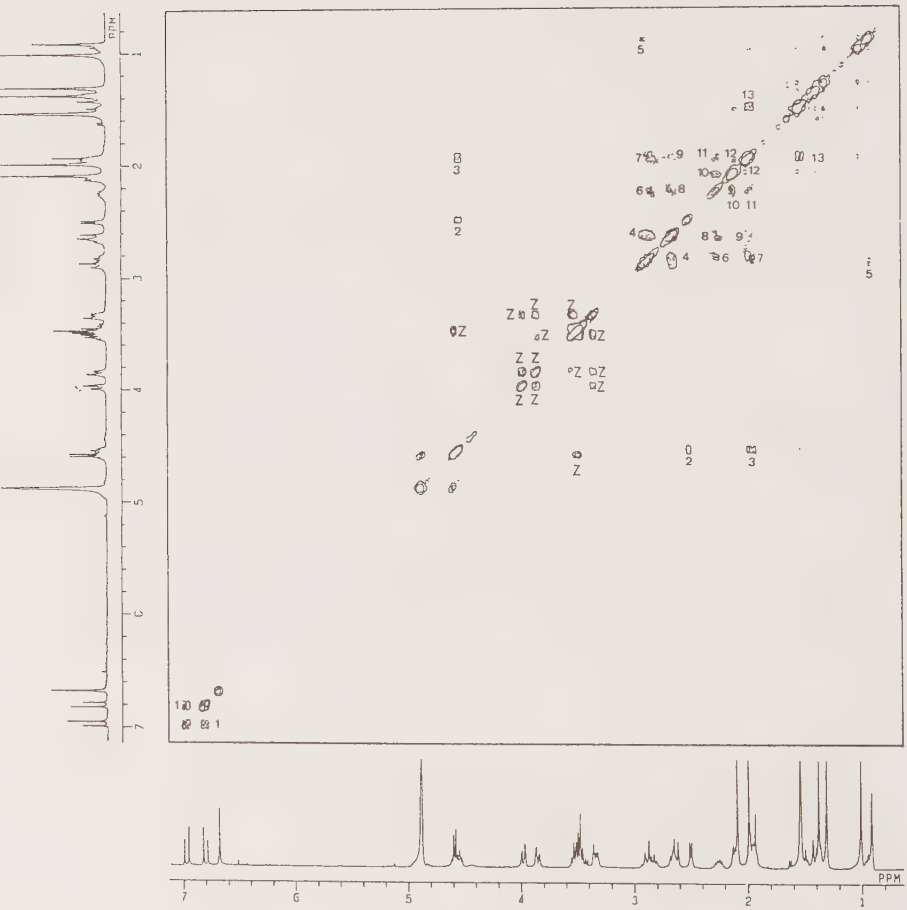


Abb. 6: Konturdiagramm des COSY-P-Spektrums von 20 (CD_3OD)

(Die auftretenden Kopplungssysteme sind in Tabelle 10 (S. 53) beschrieben; z bezeichnet Kopplungen zwischen Zuckerprotonen)

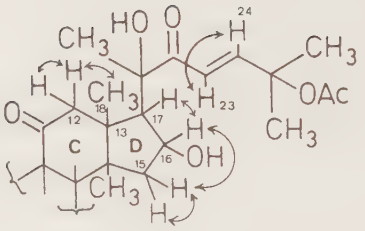
Die Auswertung des COSY-P-Spektrums von 20 (Abb. 6, S. 52) läßt folgende Kopplungssysteme erkennen:

Tabelle 10: Kopplungssysteme im $^{1}H\{^{1}H\}$-2D-NMR-Spektrum von 20 (CD_3OD)

Kopplung	1:	H-	23	mit	H-	24
"	2:	"	16	"	"	17
"	3:	"	15_B	"	"	16
"	4a:	"	6_A	"	"	6_B
"	4b:	"	12_A	"	"	12_B
"	5:	"	12_B	"	$\underline{CH}_3$-	18
"	6:	"	6_B	"	H-	7_B
"	7:	"	6_B	"	"	7_A
"	8:	"	6_A	"	"	7_B
"	9:	"	6_A	"	"	7_A
"	10:	"	7_B	"	"	8
"	11:	"	7_A	"	"	7_B
"	12:	"	7_A	"	"	8
"	13:	"	15_A	"	"	15_B

Kopplung 1, 2, 3, 4b, 5 und 13 bestätigten das Strukturelement 25 und damit die früher bereits konstatierte Übereinstimmung in diesem Molekülbereich mit 21.

25



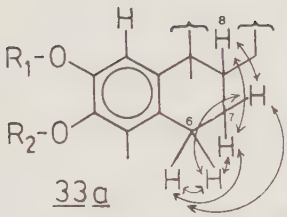
Von Bedeutung war vor allem, daß das etwas verbreiterte Dublett von H-12_B(δ=2.88 ppm), eine Kopplung auf die Methylgruppe 18 (an C-13 fixiert) zeigt: Dieser Befund gestattete den sicheren Ausschluß einer (alternativen) C-12-Ketogruppe.

Die Kopplungen 4a,6,7,8,9,10,11 und 12 belegten die Übereinstimmung der vorhandenen Strukturelemente im Bereich des Ringes B mit den Arbeitshypothesen 33 a bis 33 f:

Die Resonanzen der beiden benzylischen Protonen 6_A und 6_B wurden eindeutig zugeordnet durch die Kopplungen mit H-7_A und H-7_B, deren Signallagen in Korrelation mit Cucurbitacin F (34) festgelegt worden waren.

Das Modell von 33 a weist Diederwinkel von etwa 90° zwischen einem der beiden H-6 und dem H-7 auf, das auch mit H-8 einen 90°-Winkel einschließt. Dieser Befund sollte zu kleinen Kopplungskonstanten zwischen diesen Protonen führen [95].

Dies bestätigte sich, denn die Kopplung von H-6_A auf H-7_A ist nur "schwach" (kleine Kopplungskonstante), ebenso wie die Kopplung von H-8 auf H-7_A. Letzteres äußert sich im Kopplungsmuster von H-8, das als nur leicht verbreitertes Dublett aufspaltet.



33a

entweder R_1=ß-Gluc, R_2=H_3

oder R_1=H R_2=ß-Gluc

Das Signal des noch nicht zugeordneten Protons 15_A konnte erkannt werden durch den Nachweis der Kopplung mit H-15_B, das seinerseits mit H-16 koppelt. H-15_A zeigt sich als angedeutetes Dublett, dessen eine Signalhälfte unter den CH_3-Resonanzen 26 und 27 bei 1.54 ppm liegt.

Nicht sicher zugeordnet werden konnten die chemischen Verschiebungen von CH_3-19 und CH_3-21 (δ=1.30/1.37 ppm), über deren Lage in Cucurbitacinen in der Literatur widersprüchliche Daten zu finden sind.

Während Velde und Lavie [78] für CH_3-19 eine Resonanzlage von 1.42 ppm angeben und für CH_3-21 eine von 1.34, legen Ripperger und Seifert [68] CH_3-21 auf 1.43 ppm fest (jeweils in $CDCl_3$).

2.6.2 $^{13}C\{^1H\}$-2D-NMR-Spektren

Bei $^{13}C\{^1H\}$-Shift korrelierten Spektren werden die ^{13}C-Signale einer Verbindung auf der einen Frequenzachse als normales Breitband-entkoppeltes Spektrum aufgezeichnet, auf der anderen Achse dagegen die Protonen. Sichtbar gemacht werden bei dieser Methode Kopplungen von Protonen mit Kohlenstoffatomen. Es gibt die Möglichkeit große Kopplungen, das heißt, Kopplungen über eine Bindung aufzunehmen ($^1J_{C,H}$) oder kleine

Kopplungen über 2-3 Bindungen (^{13}C, ^{1}H long range).

Bei der ersten Methode wird im Konturdiagramm der Sitz eines Protons an einem bestimmten C-Atom durch Auftreten eines Kreuzungssignales im Konturdiagramm nachgewiesen. Man findet die Kopplungspartner in gleicher Weise wie beim $^{1}H\{^{1}H\}$-2D-Spektrum.

Die zweite Meßmethode registriert Kopplungen in der Größenordnung, wie diese bei der Wechselwirkung von Protonen mit weiter entfernten C-Signalen (über zwei bis drei Bindungen) auftreten. Es können so auch für quartäre C-Atome wertvolle Zuordnungshilfen gewonnen werden. Im Fall von 20 waren diese Erkenntnisse für den eindeutigen Strukturbeweis von großer Bedeutung.

Abb. 7 (Seite 57) zeigt das ^{1}J-2D-Spektrum von 20, bei dem das Breitband-entkoppelte ^{13}C-NMR-Spektrum (0 - 150 ppm) gegen das ^{1}H-NMR-Spektrum (0 - 5.0 ppm) aufgetragen ist.

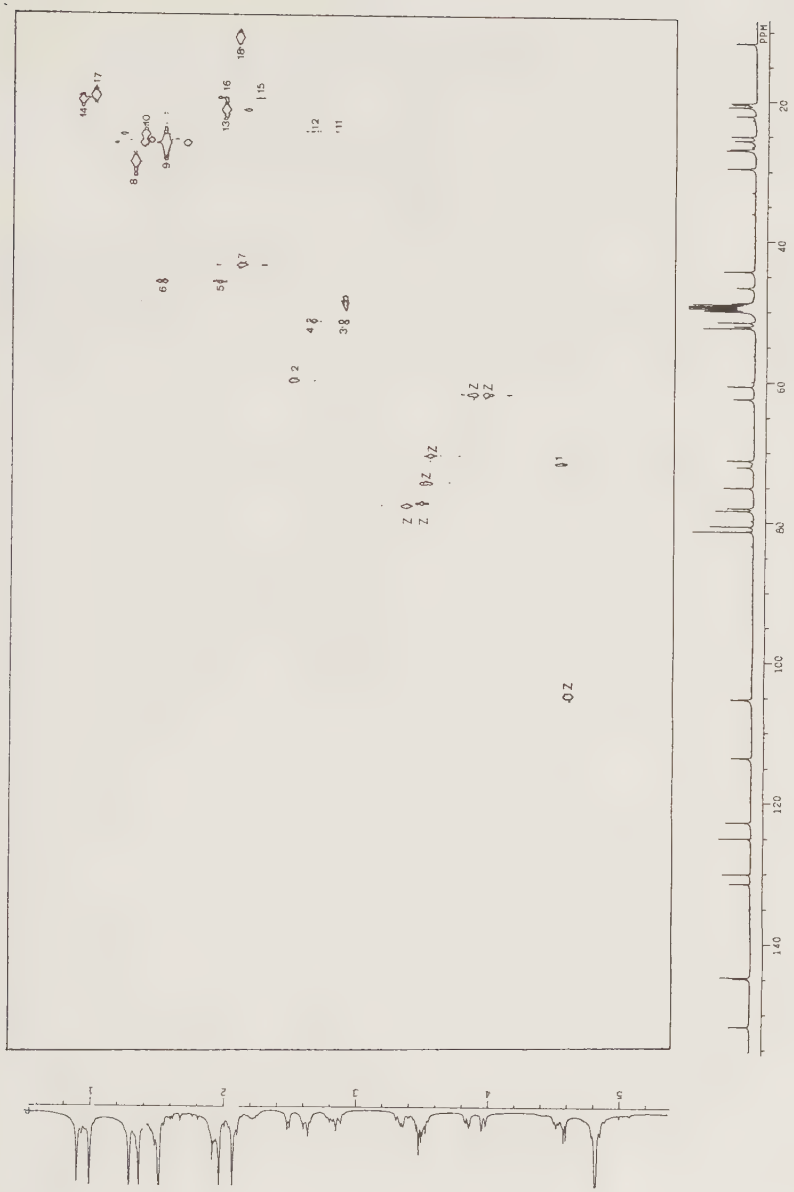
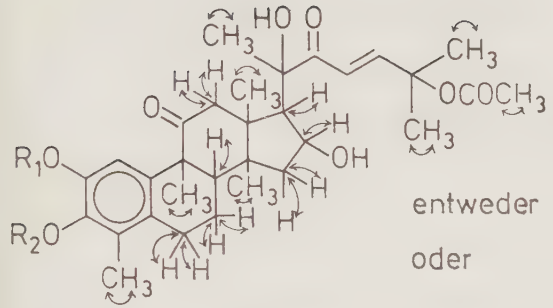


Abb. 7: Konturdiagramm des ^{1}J-$^{13}C\{^{1}H\}$-Shift korrelierten 2D-NMR-Spektrums von 20 (CD_3OD).
(Die auftretenden Kopplungssysteme sind in Tab. 11 (S.58) beschrieben; z bezeichnet Kopplungen des Zuckeranteils)

Die Auswertung führte zu folgenden Ergebnissen:

Tabelle 11: Kopplungssysteme im ^{1}J-$^{13}C\{^{1}H\}$-Shift korrelierten 2D-NMR-Spektrum von 20 (CD_3OD)

Kopplung	1:	H-	16	mit	C-	16
"	2:	"	17	"	"	17
"	3:	"	12_B	"	"	12
"	4:	"	12_A	"	"	12
"	5:	"	15_B	"	"	15
"	6:	"	15_A	"	"	15
"	7:	"	8	"	"	8
"	8:	$\underline{C}H_3$-	19	"	"	19
"	9:	$\underline{C}H_3$-	26/27	"	"	26/27
"	10:	$\underline{C}H_3$-	21	"	"	21
"	11:	H-	6_B	"	"	6
"	12:	"	6_A	"	"	6
"	13:	$\underline{C}H_3$-	CO	"	$\underline{C}H_3$-	CO
"	14:	$\underline{C}H_3$-	18	"	C-	18
"	15:	H-	7_B	"	"	7
"	16:	"	7_A	"	"	7
"	17:	$\underline{C}H_3$-	30	"	"	30
"	18:	$\underline{C}H_3$-	28	"	"	28



33a

Dieses Spektrum erlaubte u.a. die eindeutige Festlegung der CH_3-Gruppen 19 und 21: Die Kopplung des ^{13}C-Signals bei 25.0 ppm auf die Protonen der CH_3-Gruppe bei 1.37 ppm sowie des ^{13}C-Signals 29.3 ppm auf die CH_3-Protonen bei 1.30 ppm löste die Zuordnungsfrage, die beim COSY-P-Experiment noch offen geblieben war. Die Protonen der Methylgruppe 21 am OH-substiuierten C-20 treten bei tieferem Feld in Resonanz (1.37 ppm) als die CH_3-Funktion 19 (1.30 ppm), die das benzylische C-9 substituiert.

Die Frage nach der Resonanzzuordnung von $H\text{-}15_A$ (bei δ=1.54 ppm) konnte nochmals abgesichert werden. Beide geminalen Protonen 15 zeigen eine Kopplung auf C-15 (bei 46.1 ppm), dessen Resonanzlage aufgrund von Vergleichsdaten aus 21 festgelegt ist [78,79].

Das ^1H-Signal bei 4.53 ppm, das als breites Triplett aufspaltet und durch Korrelation mit 21 als H-16 erkannt worden war, macht eine Kopplung auf das ^{13}C-Signal bei 71.4 ppm, und legt dieses damit als C-16 fest. Das Signal bei 70.8 ppm mußte somit zur Glucose-Einheit von 20 gehören (C-4').

Die Protonen 12_A und 12_B koppeln beide auf ein Signal bei 51.6 ppm oder eines bei 51.7 ppm. Diese beiden Resonanzen spalten im "off resonance"-NMR-Spektrum als Singulett und Triplett (Tab. 3, S. 35) auf; damit war C-12 als Kopplungspartner festgelegt.

Auch die Entscheidung zwischen den Signalen von C-6 und C-7 traf man an Hand des ^1J-$^{13}C\{^1H\}$-Shift korrelierten 2D-NMR-Spektrums durch die Kopplung der Protonen 6_A und 6_B (Multiplett bei 2.60 - 2.67 ppm und Multiplett bei 2.79 - 2.93 ppm) auf das ^{13}C-Signal 24.5 ppm. $H\text{-}7_A$ und $H\text{-}7_B$ (Multiplett bei 1.92 - 1.96 ppm und Multiplett bei 2.19 - 2.29 ppm) ließen das C-Atom 7 auf die Verschiebung 19.8 ppm festlegen.

Die Aufnahme eines 2D-NMR-long range-Spektrums sollte die bis dahin gewonnenen Erkenntnisse bestätigen und auch Informationen über die (weitere) Umgebung der quartären C-Atome geben. Man erhoffte sich in diesem Zusammenhang insbesondere auch eine Überprüfung, ob C-1 tatsächlich unsubstituiert vorlag und die "aromatische" CH_3-Gruppe an C-4 gebunden war (Arbeitshypothese 33 a).

Abb. 8 (S. 62) gibt das Spektrum wieder, das durch die vielen auftretenden Fernkopplungen ($^2J, ^3J$) sehr kompliziert ausfällt. Es werden die Kopplungen aufgeführt, die der endgültigen Festlegung bereits aufgefundender Strukturelemente dienten (Tabelle 12).

Tabelle 12: Kopplungssysteme im $^{13}C\{^{1}H\}$-Shift-korrelierten 2D-NMR-Spektrum (long range) von 20 (CD_3OD)

Kopplung	1:	^{3}J-$\underline{CH_3}$-19	mit	C-11
"	2:	^{2}J-H-12_A	"	C-11
"	3:	^{2}J-H-12_B	"	C-11
"	4:	^{2}J-H-23	"	C-22
"	5:	^{3}J-H-24	"	C-22
"	6:	^{3}J-H-17	"	C-22
"	7:	^{3}J-$\underline{CH_3}$-21	"	C-22
"	8:	^{3}J-$\underline{CH_3}$-26/27	"	C-24
"	9:	^{3}J-H-1	"	C-3
"	10:	H-1'	"	C-2/3
"	11:	^{3}J-$\underline{CH_3}$-28	"	C-3
"	12:	^{3}J-H-1	"	C-5
"	13:	^{3}J-$\underline{CH_3}$-28	"	C-5
"	14:	^{3}J-$\underline{CH_3}$-19	"	C-10
"	15:	^{2}J-$\underline{CH_3}$-28	"	C-4
"	16:	^{2}J-H-24	"	C-23
"	17:	^{1}J-H-23	"	C-23
"	18:	^{2}J-H-24	"	C-25
"	19:	^{3}J-H-23	"	C-25
"	20:	^{2}J-$\underline{CH_3}$-26/27	"	C-25
"	21:	^{3}J-H-16	"	C-20
"	22:	^{2}J-H-17	"	C-20
"	23:	^{2}J-H-17	"	C-16
"	24:	^{2}J-H-15_A	"	C-16
"	25:	^{3}J-$\underline{CH_3}$-21	"	C-17
"	26:	^{3}J-$\underline{CH_3}$-18	"	C-17
"	27:	^{3}J-H-1	"	C-9
"	28:	^{2}J-$\underline{CH_3}$-19	"	C-9
"	29:	^{3}J-$\underline{CH_3}$-30	"	C-15
"	30:	^{3}J-$\underline{CH_3}$-19	"	C-8
"	31:	^{3}J-$\underline{CH_3}$-30	"	C-8
"	32:	^{3}J-H-8	"	C-19
"	33:	^{2}J-H-6_B	"	C-7
"	34:	^{3}J-H-17	"	C-18
"	35:	^{3}J-H-15_B	"	C-30

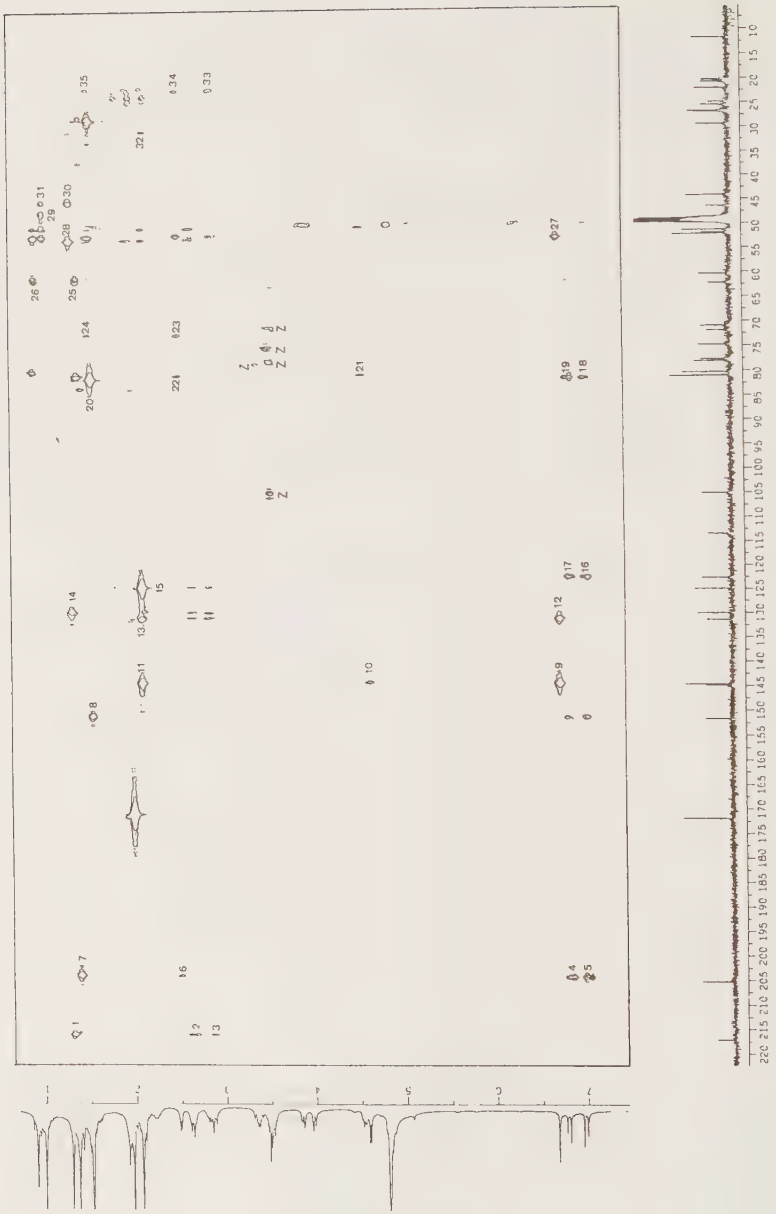
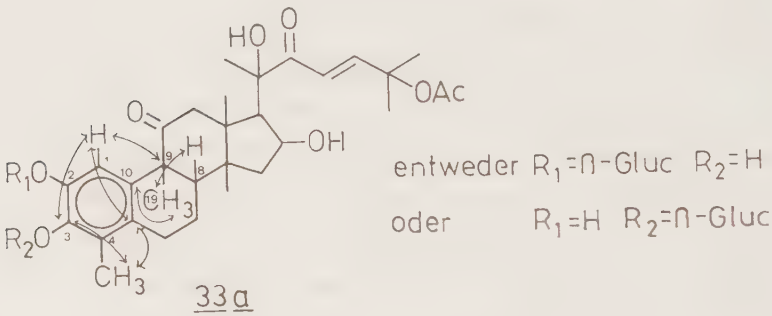


Abb. 8: Konturdiagramm des $^{13}C\{^{1}H\}$-Shift korrelierten-2D-NMR-Spektrums (long range) von 20 (CD_3OD).
(Die auftretenden Kopplungssysteme sind in Tab. 12 (S. 61) beschrieben; z bezeichnet die Kopplungen des Zuckeranteils

Mit Hilfe der oben genannten Fernkopplungen konnten bis auf folgende Resonanzen alle C-Atome festgelegt werden:
Nicht eindeutig zuzuordnen sind die Signale von C-26 und C-27 (δ=26.5 und 26.6 ppm), da ihre chemischen Verschiebungen zu ähnlich sind. Auch C-13 und C-14 können nicht endgültig auf 49.3 ppm oder 50.9 ppm festgelegt werden; die auftretenden Fernkopplungen der Protonen 8, 12, 15, 17, 18 und 30 sind sowohl mit C-13 als auch mit C-14 möglich. Für Cucurbitacin E (21) z.B. ordnen Bull und Chalmers [79] das Signal bei höherem Feld (δ=49.0 ppm) dem C-Atom 14 und das bei tieferem Feld (δ=50.9 ppm) dem angulären C-13 zu (siehe auch Abschnitt 2.7.3.1)
Offen blieb zunächst die Frage, über welche der beiden phenolischen OH-Gruppen die Glucose gebunden vorlag: das anomere Proton zeigte zwar eine Kopplung auf die Signale 144.0 und/oder 144.4, aber es war nicht mit Sicherheit festzustellen, welche dieser beiden Resonanzen zu C-2 und welche zu C-3 gehörte (siehe Abschnitt 2.7.3).
Wichtigste Information aus dem "long range"-2D-NMR-Experiment war die Beobachtung einer Kopplung des "aromatischen" Protons (δ=6.67 ppm) mit dem Signal bei 51.6 ppm oder dem bei 51.7 ppm (siehe Abb. 8, Kopplungssystem 27), die im "off resonance"-NMR-Spektrum als Singulett und Triplett aufspalten. Eine dieser beiden Resonanzen war an Hand des ^{1}J-2D-NMR-Experiments schon als C-12 zugeordnet worden und schied als Kopplungspartner aus (siehe Abb. 7, Kopplungssystem 3 und 4, S.57). Da Signal 51.6 oder 51.7 gleichzeitig eine Kopplung mit den Protonen der Methylgruppe -19 bei 1.30 ppm aufweist, konnte es sich hier nur um C-9 handeln, da ja im ^{1}J-2D-NMR-Spektrum CH_3-19 auf die chemische Verschiebung 1.30 ppm festgelegt worden war (siehe Abb. 7, Kopplungssystem 8).

Auch im "long range"-2D-NMR-Spektrum wird die Zuordnung der Resonanzen von CH_3-19 (an C-9) weiter abgesichert: einmal durch die Kopplung von H-8 mit dem Kohlenstoffatom der CH_3-19, und andererseits durch eine Kopplung der Protonen der CH_3-19 mit C-10 (siehe Abb.8, Kopplungssysteme 32 und 14, S. 62).



33 a

Zusammenfassend läßt sich hier feststellen, daß die durch "zweidimensionale" NMR-Spektroskopie gewonnen Erkenntnisse den arbeitshypothetischen Strukturvorschlag 33 a für Verbindung 20 bestätigten und 33 b - 33 f sicher ausschlossen.

Da deutlich wurde, daß 20 eine Verbindung einer neuen Substanzklasse darstellte und die Isolierung weiterer strukturähnlicher Nebenverbindungen zu erwarten war (siehe Abschnitt 2.8), nannten wir den Hauptvertreter 20 Fevicordin A-glucosid.

Die endgültige Festlegung aufgrund der 2D-NMR-Spektroskopie für die ^{13}C- und ^{1}H-Resonanzlagen von 20 ist den Tabellen 13, 14 und 15 zu entnehmen.

Tabelle 13: NMR-Daten von 20 (CD_3OD; 100,41 bzw. 400 MHz)

C-Atom	δ[ppm]	H-Atom	δ[ppm]
C-28	11.0	$H\text{-}15_A$	1.54 (d, J=15 Hz)
C-30	19.8	$H\text{-}15_B$	1.92-1.96 (m)
C-7	19.9	$H\text{-}7_A$	1.92-1.96 (m)
C-18	20.4	H-8	2.10 (d,J=8.5 Hz)
$\underline{C}H_3\text{-}CO$	21.8	$H\text{-}7_B$	2.19-2.29 (m)
C-6	24.5	H-17	2.50 (d,J= 7 Hz)
C-21	25.0	$H\text{-}12_A$	2.61 (d,J=15Hz)
C-26* }	26.5	$H\text{-}6_A$	2.60-2.67 (m)
C-27* }	26.6	$H\text{-}6_B$	2.79-2.93 (m)
C-19	29.3	$H\text{-}12_B$	2.88 (d,J=15 Hz)
C-8	43.3	H-2',3',4',5'	3.32-3.55 (m)
C-15	46.1	$H\text{-}6_A'$	3.83 (dd,J_1=12 Hz,J_2=4 Hz)
C-14 * }	49.3	$H\text{-}6_B'$	3.97 (dd,J_1=12 Hz,J_2=2,5 Hz)
C-13 * }	50.9	H-16	4.53 (bt)
C-12 * }	51.6	H-1'	4.58 (d,J=7 Hz)
C-9* }	51.7	H-1	6.67 (s)
C-17	59.6	H-23	6.80 (d,J=16 Hz)
C-6'	62.0	H-24	6.97 (d,J=16 Hz)
C-4'	70.8		
C-16	71.4		
C-2'	74.3	$\underline{C}H_3$-Gruppe	
C-3'	78.3		
C-5'	78.7	18	0.90
C-20	80.1	30	0.99
C-25	80.6	19	1.30
C'-1	104.5	21	1.37
C-1	113.2	26	1.54
C-23	122.2	27	1.54
C-4	124.4	$CH_3\text{-}CO$	1.97
C-10	129.5	28	2.07
C-5	130.9		
C-3* }	144.0		
C-2* }	144.4		
C-24	151.4		
$CH_3\text{-}\underline{C}OO$	171.4		
C-22	204.7		
C-11	216.1		

* Zuordnung gegebenenfalls umgekehrt

2.7 Derivate und Abbauprodukte

2.7.1 Derivate zur Festlegung des Substitutionsmusters an Ring A

2.7.1.1 Herstellung des Aglykons Fevicordin A (43)

Die Glykosidspaltung von 20 mit methanolischer HCl führte zur völligen Zersetzung des Aglykons.

Mit β-Glucosidase verläuft die Spaltung äußerst langsam.

Dieses Phänomen ist für Cucurbitacin-Glucoside bekannt [96]; beschrieben wird andererseits auch deren leichte Spaltbarkeit mit Cellulase [96], die schließlich auch bei 20 erfolgreich angewandt wurde.

In Ausbeuten von etwa 60 % spaltet Cellulase in Wasser bei pH 7 und Raumtemperatur innerhalb weniger Stunden das Hauptglucosid 20 in Glucose und das Aglykon, das wir Fevicordin A (43) nennen wollen.

Cellulase ist ein Gemisch von β-1,4-Glucan-4-Glucanohydrolasen und wird aus Aspergillus-Kulturen gewonnen. Sie besitzt Wirksamkeit gegenüber Carboxymethylcellulose, Pektin, Cellulose, Glykosiden und verschiedenen Hemicellulosen. Sie kann im neutralen bis sauren pH-Milieu (bis 3.5) angewendet werden bei Temperaturen bis 50°C.

43 konnte durch Ausschütteln mit Toluol von nicht umgesetztem 20 abgetrennt werden, das wiederum mit Essigester aus der wässrigen Phase extrahierbar ist. Beim Einengen der organischen Phase fällt 43 als amorphes, weißes Pulver an.

Die Sauerstoffempfindlichkeit von 43 wird durch Licht, Wärme und Kieselgel beschleunigt und ist auf dessen leichte Oxidierbarkeit zum o-Chinon 44 zurückzuführen (Siehe Abschnitt 2.7.1.2).

Diese Labilität erfordert besondere Vorsichtsmaßnahmen bei der

Aufarbeitung, Isolierung und Aufbewahrung von 43. Säulenchromatographische Reinigungen wurden daher unter Lichtschutz, das Eingengen der Fraktionen unter N_2-Begasung vorgenommen. Auch andere chemische Handhabungen wie Pipettieren erfolgten unter Schutzgas. Die anfänglich hohen Verluste bei der chromatographischen Reinigung ließen sich zurückdrängen, wenn daneben auch noch die Lösungsmittel entgast waren. Schnelle Chromatographie mit kurzer Kontaktzeit am Kieselgel und die Wahl chloroform- und alkoholfreier Lösungsmittelsysteme (Cyclohexan/Essigester; Benzin/Aceton) trugen ebenfalls dazu bei, Zersetzungserscheinungen zu verhindern.

Elektronen- und IR-Spektrum von 43:

Lage und Intensität der Maxima des Elektronenspektrums entsprechen weitgehend denen von 20. Bei Zusatz von NaOH erfährt das Maximum bei 287 nm einen ausgeprägten Basen-Shift nach 300 nm und 325 nm, was darauf zurückgeführt werden kann, daß zwei phenolische OH-Funktionen frei vorliegen. 20, mit nur einer freien phenolischen OH-Gruppe, unterliegt dagegen unter gleichen Bedingungen einer Rotverschiebung nach 295 nm. Das IR-Spektrum ist demjenigen von 20 sehr ähnlich. Lediglich im Bereich der OH-Banden gibt es Unterschiede.

Massenspektren:

Das DCI-MS(NH_3) zeigt bei höchster Masse ein starkes Ion mit m/z 560, entsprechend dem Molekülanlagerungsion $[M+NH_4^+]$. Im EI-MS tritt ein Molekülion bei m/z 542 nicht auf. Das Ion höchster Masse erscheint bei m/z 482, und dürfte durch (thermische) Abspaltung von Essigsäure

aus der Seitenkette entstehen. Im übrigen zeigt das EI-MS ein sehr ähnliches Fragmentierungsmuster wie 20 (Siehe Abb. 2, S. 27).

Um die in Analogie zu Cucurbitacin E (21) und D (5) entstehenden Fragmente belegen zu können, wurden an 43 hochaufgelöste Messungen durchgeführt und so die Zusammensetzung der Massen 482 ($C_{29}H_{38}O_6$), 386 ($C_{23}H_{30}O_5$), 369 ($C_{23}H_{29}O_4$) und 96 ($C_6H_8O_1$) ermittelt. Die Bildung der Schlüsselfragmente bei Cucurbitacin D (5) wurde in Abschnitt 2.4.3 erläutert. Es bestätigte sich für 43 die Abspaltung der Seitenkette in der Art, wie sie bei Cucurbitacinen, mit entsprechender Seitenkettenkonstitution belegt ist [76].

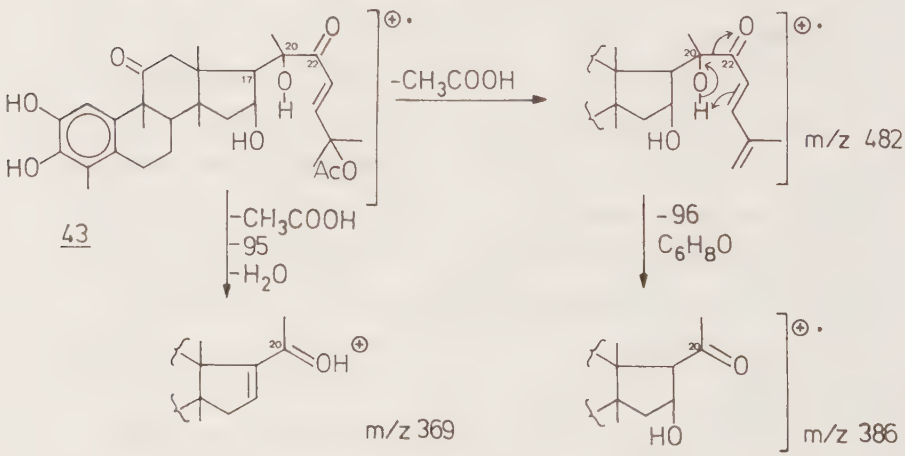


Abb. 9: Entstehen der Fragmente m/z 482, 386 und 369 im EI-MS von 43

^{13}C-NMR-Spektrum:

Aufgrund der Labilität von 43 wurde die Messung nicht in $CDCl_3$ vorgenommen, sondern Benzol-d_6 als Lösungsmittel verwendet. Tabelle 14 führt die Änderungen der Resonanzlagen von 43 im Vergleich zu 20 auf (S. 70).

Die Signallagen sind sehr ähnlich: Außer dem "Fehlen" der Zucker-Resonanzen fällt im wesentlichen nur ein Hochfeld-Shift von C-1 um etwa 3 ppm auf. Dies konnte als Hinweis dafür gedeutet werden, daß der Glucoserest in 20 an C-2 fixiert ist.

^{1}H-NMR-Spektren:

Zwecks besserer Korrelierbarkeit mit den Protonenresonanzen von Cucurbitacin E (21) (Tab. 6, S. 44) wurde zunächst ein Spektrum in $CDCl_3$ aufgenommen. Trotz kurzer Meßzeit zeigte sich im DC, daß kleine Mengen Zersetzungsprodukte schon während des Experiments entstanden waren.

In Benzol-d_6 erwies sich 43 als beständiger. Der Übergang auf das aromatische Lösungsmittel hatte aber zufolge, daß einige Signale deutliche Shifts erfuhren, was insbesondere die Zuordnung der Methylgruppen in Frage stellte. Weiterhin beobachteten wir bei den Messungen eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit der Spektren in Bezug auf einige Resonanzlagen und auch Signalbreiten. Besonders ausgeprägte Signalverbreiterung ergab sich z.B. bei den Protonen an C-12.

Tabelle 15 (S. 71) stellt die Protonenresonanzen von 43 denen von 20 gegenüber.

Tabelle 14: Gegenüberstellung der ^{13}C-NMR-Resonanzsignale von 43 und 20

Lösungsmittel/Feldstärke	C_6D_6/22,5 MHz	CD_3OD/100,41 MHz
C-Atom	43 δ [ppm]	20 δ [ppm]
1	110.0	113.2
2	142.6	144.4
3	142.1 *	144.0 *
4	123.3	124.4
5	128.5 **	130.9
6	24.0	24.5
7	19.8	19.9
8	42.9	43.3
9	51.2	51.7
10	129.2 **	129.5
11	215.9	216.1
12	51.2	51.6
13	50.7	50.9
14	49.1 *	49.3 *
15	45.6	46.1
16	71.6	71.4
17	58.6	59.6
18	20.2	20.4
19	29.4	29.3
20	79.0	80.1
21	24.3	25.0
22	202.9	204.7
23	121.4	122.2
24	151.3	151.4
25	79.5	80.6
26	26.3	26.5
27	26.3	26.6 *
28	11.5	11.6
30	19.8	19.8
$\underline{C}H_3$-CO	21.5	21.8
CH_3-$\underline{C}$OO	170.1	171.4
1'		104.5
2'		74.3
3'		78.3
4'		70.8
5'		78.7
6'		62.0

* Zuordnungen gegebenenfalls umgekehrt

** Zuordnungen gegebenenfalls umgekehrt

Tabelle 15: Gegenüberstellung der ^{1}H-NMR-Resonanzsignale von 43 und 20 (400 MHz)

H-	43 / $CDCl_3$ δ[ppm]	20 / CD_3OD δ[ppm]
1	6.40 (s)	6.67 (s)
6_A	2.60-2.70 (m)	2.60-2.67 (m)
6_B	2.70-2.80 (m)	2.79-2.93 (m)
7_A	1.63-2.00 (m)	1.92-1.96 (m)
7_B	2.19-2.30 (m)	2.19-2.29 (m)
8	2.08 **	2.10 (d,J=8,5 Hz)
12_A	2.73 (d,J=15 Hz)	2.61 (d,J=15 Hz)
12_B	2.93 (d,J=15 Hz)	2.88 (d,J=15 Hz)
15_A	**	1.54 (d,J=15 Hz)
15_B	1.63-2.00 (m)	1.92-1.96 (m)
16	4.30 (bt)	4.53 (bt)
17	2.45 (d,J=7 Hz)	2.50 (d,J=7 Hz)
23	6.40 (d,J=16 Hz)	6.80 (d,J=16 Hz)
24	7.02 (d,J=16 Hz)	6.97 (d,J=16 Hz)
1'		4.58 (d,J=7,5 Hz)
2',3' 4',5'		3.32-3.55 (m)
6_A'		3.83 (dd,J_1=12 Hz, J_2= 4 Hz)
6_B'		3.97 (dd,J_1=12 Hz, J_2= 2,5 Hz)
$\underline{CH_3}$-		
18	1.00	0.90
19	1.38 *	1.30
21	1.40 *	1.37
26	1.52 *	1.54
27	1.54 *	1.54
28	2.07	2.07
30	1.04	0.99
CH_3-CO	2.00	1.97

* Zuordnung gegebenenfalls umgekehrt

** Resonanz wird zum Teil durch CH_3-Signal verdeckt

Die Signallagen im $CDCl_3$-Spektrum von 43 können gut mit denen von 20 korreliert werden, obwohl letzteres in CD_3OD aufgenommen ist. Damit sind die Zuordnungen aufgrund des COSY-P-Spektrums von 20 festgelegt (Siehe Abb. 6, S. 52).

2.7.1.2 6,7-Dehydro-fevicordin A-2,3-dion (44)

Wie in Abschnitt 2.7.1.1 erwähnt, wird die Oxidationsempfindlichkeit von 43 auf das Brenzcatechin-Strukturelement des Ringes A zurückgeführt. Das Oxidationsprodukt sollte daher das entsprechende "o-Chinon" sein, was mit der auftretenden intensiv gelben Färbung in Übereinstimmung ist.

Ziel war es daher, das Oxidationsprodukt in ausreichender Menge für strukturanalytische Untersuchungen herzustellen.

Erste Oxidationsversuche wurden unternommen, indem man 43 den "Agentien" aussetzte, die zur Gelbfärbung führten: Sonnenlicht und Luftsauerstoff. Dünnschichtchromatographisch konnte der Verlauf der Oxidation verfolgt werden: Unter allmählicher Abnahme an Ausgangsverbindung entsteht das gelbe Oxidationsprodukt. Auf DC (KG) bleibt dieses jedoch bei längerem Kieselgel-Kontakt nicht einheitlich, was durch zweidimensionale DC nachgewiesen wurde (Entwickeln des DC in der 2. Richtung nach 24-stündiger Wartezeit), sondern zersetzt sich rasch weiter in eine Vielzahl verschiedener, teilweise farbiger Produkte.

o-Chinone sind sehr reaktive Verbindungen [97-102]. Sie sind sowohl gegenüber elektrophilem, wie auch nukleophilem Angriff empfindlich [100] und können gegebenenfalls mit Lösungsmitteln reagieren [97,99]; Mason[97]

untersuchte z.B. die Stabilität verschiedener o-Chinone und stellte signifikante Änderungen im Elektronenspektrum der Chinone in Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel und Alter der Lösung fest.
Daß o-Benzochinone nach dem Prinzip einer Diels-Alder-Reaktion dimerisieren können, wurde erstmals von Horner und Sturm nachgewiesen [99].
Die schonendste Art Hydrochinone zu Chinonen zu oxidieren, besteht in der Verwendung von organischen Oxidationsmitteln.
In der jüngeren Literatur werden häufig spezielle Chinone als Dehydrierungsmittel angewandt. Erfolgreich eingesetzt wurden bisher Tetrachlor-o-benzochinon (TCC) [102] oder Dicyano-dichlor-p-benzochinon (DDQ) [103], die auch in der Kälte (bis -30°C) in inerten Lösungsmitteln wie Diethylether verwendbar sind.
43 wurde mit DDQ in Ether zunächst in äquimolaren Mengen behandelt. Es entstand in einheitlichem Reaktionsverlauf das gelbe Oxidationsprodukt, unter Abnahme der Ausgangsverbindung. Ein quantitativer Umsatz war erst festzustellen mit einem mindestens zweimolaren Überschuß DDQ. Die Abtrennung des reduzierten DDQ erfolgte chromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Essigester (1/1). Das Fevicordin A-o-chinon-Derivat 44 konnte in etwa 40 % Ausbeute erhalten werden.*)

Massenspektren

Im EI-MS von 44 tritt als Ion höchster Masse m/z 480 mit zwei Masseneinheiten weniger als Fevicordin A (43) auf. Dieses dürfte durch thermischen Verlust der Essigsäure aus der Seitenkette entstehen. Das

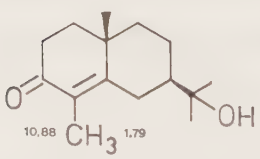
*) Ausbeuteverluste an 44 werden auf den Kontakt zum Kieselgel zurückgeführt, das die Zersetzung reaktiver Verbindungen beschleunigen kann [104].

Fragmentierungsmuster ist demjenigen von 20 (siehe Abb. 2, S. 27) und 43 ähnlich; statt m/z 386 wie bei 20 und 43 erscheint jedoch m/z 384, und an Stelle von m/z 189/190 wird m/z 187/188 registriert. Im DCI(NH_3) von 44 tritt als Ion höchster Masse m/z 558 auf.

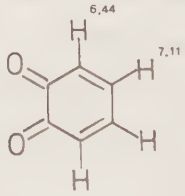
^{1}H-NMR-Spektrum

Die ^{1}H-NMR-Resonanzlagen von 44 sind im Vergleich zu denjenigen von 43 deutlich verschoben (Abb. 10, S. 75). Da durch die Oxidation der aromatische Charakter von 43 aufgehoben wird, treten sowohl das Proton an C-1 (δ=6.09 ppm), als auch die CH_3-Gruppe an C-4 (δ=1.74 ppm) bei höherem Feld in Resonanz als bei 43.

Zum Vergleich seien die ^{1}H- und ^{13}C-Resonanzlagen (in $CDCl_3$) der vinylisch gebundenen CH_3-Gruppe in Carrison (45), einem Sesquiterpen aus Carissa edulis [86,105] und die Protonenresonanzen in Benzo-o-chinon (46) [106] angegeben:



45



46

H-8, das bei 43 durch die Resonanz der "aromatischen" CH_3-Gruppe verdeckt wird, kann nun bei 44 gut beobachtet werden.

Es fällt außerdem vor allem auf, daß im Resonanzbereich der olefinischen Protonen 2 Signale bei 6.19 (d,J=11 Hz) und 5.55 ppm (dd,J_1=11 Hz, J_2=8 Hz) zu beobachten sind. Andererseits ist der Bereich zwischen

2 und 3 ppm gegenüber dem Spektrum von 43 deutlich vereinfacht. Daraus leitet sich für 44 das Strukturelement 47 mit einer cis-konfigurierten Doppelbindung ab.

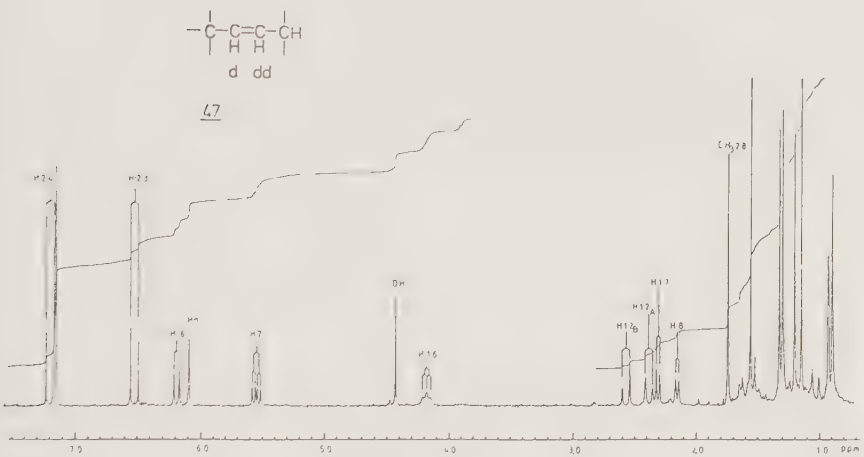
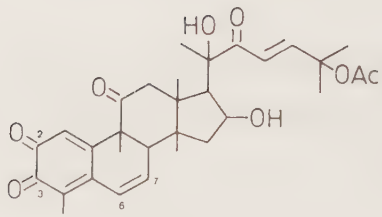


Abb. 10: ^{1}H-NMR-Spektrum von 44 (C_6D_6; 250 MHz)

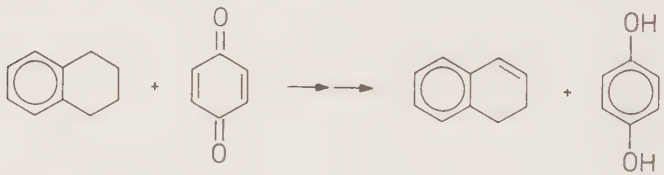
Der "Einbau" von 47 in das Fevicordin-Gerüst konnte ausschließlich im Ring B stattgefunden haben. Nur in diesem Ring ist eine $-CH_2-CH_2-$ Gruppierung enthalten, aus der durch Dehydrierung 47 hervorgehen kann. Im Zuge der Behandlung von 43 mit DDQ wird also gleichzeitig auch eine Doppelbindung zwischen den C-Atomen 6 und 7 eingeführt.



44

Daß Tetraline von p-Chinonen dehydriert werden können, belegt auch eine Publikation von J. Pajak und K.R. Brower [107], die sich mit dem Transfer von Wasserstoff in Tetralin-Verbindungen befaßt.

Folgende Reaktion wird beschrieben:

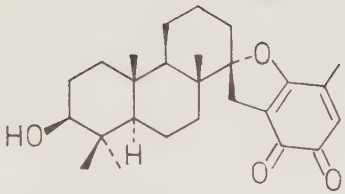


Elektronen- und IR-Spektrum

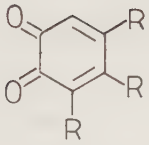
Das Elektronen-Spektrum von 44 zeigt Maxima bei 450 nm (log ε=3,14) und 340 nm (log ε=3,47). Lage und Intensität sind in gewisser Übereinstimmung mit Stypoldion (48), einem natürlich vorkommenden o-Chinon aus der Meeresalge Stypopodium zonale [108]. Die Autoren geben für 48 Maxima bei 475 nm (log ε=2,94) und 270 nm (log ε=3,39) an.

Maxima von Benzo-o-chinon (46) liegen bei 368 nm (log ε=3,28) und 254 nm (log ε=3,04) [98], von 3,4,5-Trimethyl-benzo-o-chinon (49) bei 425 nm (log ε=3,11) und 265 nm (log ε=3,33) [98].

Die Abweichungen von 44 im Vergleich zu 46, 48 und 49 können mit der zusätzlich eingeführten, konjugierten Doppelbindung im Ring B erklärt werden.



48



46 R=H
49 R=CH_3

Die Carbonylschwingungen des IR-Spektrums weisen Bandenlagen auf, die mit den genannten Verbindungen 48 und 49 vergleichbar sind. Banden bei 1650 und 1660 cm^{-1} sind für o-Chinone typisch [98,108].

^{13}C-NMR-Spektrum

Zusätzlich zu den zwei Carbonylresonanzen im ^{13}C-NMR-Spektrum von 43 erscheinen bei 44 zwei weitere bei 179.9 und 180.4 ppm. Diese Resonanzlagen sind sehr typisch für o-Chinon-Carbonyl-Funktionen (siehe Tab. 16).

Im Doppelbindungsbereich "fehlen" die Signale bei 142.6 und 142.1, die in 43 den C-Atomen 2 und 3 zugeordnet werden. Außerdem ergeben sich wie im ^{1}H-NMR-Spektrum deutliche Verschiebungen.

Die eingeführte Doppelbindung äußerst sich durch zwei "neue" Resonanzen (im sp^2-hybridisierten Bereich); zwischen 10 und 30 ppm treten nur noch 8 Signale auf statt 10, wie im Spektrum von 43.

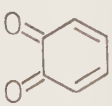
Die Zuordnung der C-Atome 1,4,5,10,6 und 7 konnte für 44 nicht gesichert getroffen werden.

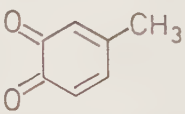
^{13}C-Daten von o-Chinonen sind in der Literatur nur sehr spärlich angegeben; sie sind zudem noch widersprüchlich, im Hinblick auf die Zuordnung der Resonanzen von C-3 und C-4 des Benzo-o-chinon (46) [106,109].

R. Hollenstein und W. von Philipsborn [106] geben folgende chemische Verschiebungen für 46 bzw. 4-Methyl-benzo-o-chinon 50 an:

Tabelle 16: ^{13}C-NMR-Resonanzlagen der o-Chinone 46 und 50

C-Atom	1 δ[ppm]	2 δ[ppm]	3 δ[ppm]	4 δ[ppm]	5 δ[ppm]	6 δ[ppm]
46	180.4	180.4	130.8	139.7	139.7	130.8
50	179.2	180.1	127.7	152.0	143.4	129.5

46 

50 

Aufgrund eines "off resonance" - ^{13}C-NMR-Spektrums kann für 44 lediglich eine Unterteilung in quartäre und protonentragende sp^2-hybridisierte C-Atome getroffen werden.

-RCH = :(C-1,C-6,C-7) 123.0 125.1 133.4 [ppm]

R_2C = :(C-4,C-5,C-10) 132.1 136.3 155.0 [ppm]

Abb. 11 gibt das ^{13}C-NMR-Spektrum von 44 wieder.

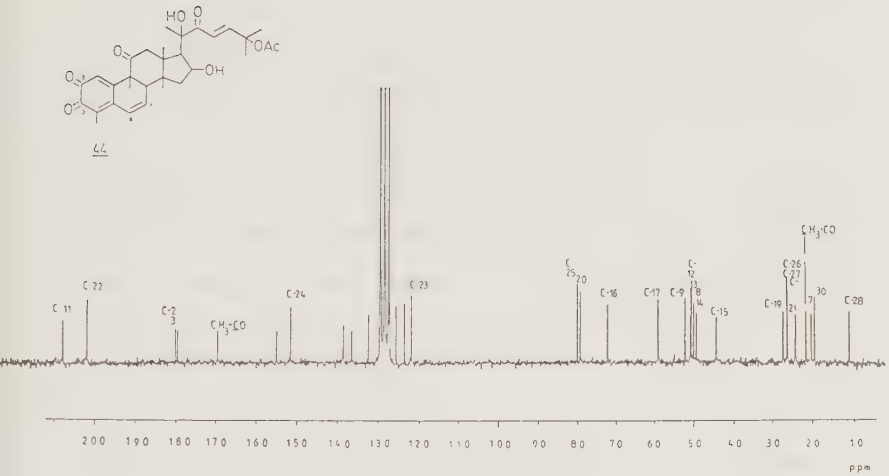


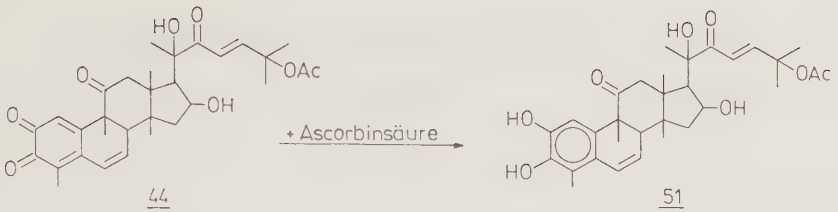
Abb. 11: ^{13}C-NMR-Spektrum von 44 (C_6D_6) 22,5 MHz

Unter dem Gesichtspunkt der neu eingeführten Doppelbindung im Molekül bestand ein Widerspruch zu den MS-Messungen. Im Vergleich zu 43 sollte sich ein um 4 Masseneinheiten verringertes Molekulargewicht, also m/z 538 bzw. m/z 478 nach thermischer Abspaltung der Essigsäure aus der Seitenkette ergeben.

Es wird in der Literatur beschrieben, daß bei MS-Untersuchungen von Chinonen außer M^+ auch Ionen bei $[M + 2^+]$ auftreten [98, 108, 110]. Dieser Effekt wird auf Feuchtigkeitsspuren innerhalb der Apparatur zurückgeführt und mit dem hohen Redoxpotential der o-Chinone erklärt [98,110]. Da im MS von 44 jedoch nur $[M + 2^+]$ registriert wird, sollte eine völlige thermische Reduktion zum Hydrochinon unter Erhalt der C-6/C-7-Doppelbindung im Massenspektrometer stattfinden.
Um dies nachzuweisen, wurde 44 mit einer äquimolaren Menge Ascorbinsäure behandelt, was zu einer "Entfärbung" des tiefgelben 44 führte. Auf DC ließ sich eine neue Verbindung 51 detektieren, die im Lauf- und Ansprühverhalten 43 wieder sehr ähnlich, aber nicht identisch mit diesem war. Protonen- und ^{13}C-NMR zeigten, daß die Reduktion zum Hydrochinon unter Erhalt der 6/7-Doppelbindung stattgefunden hatte.

Das EI-MS und DCI-MS (NH_3) der mit Vitamin C reduzierten Verbindung 51 stimmt völlig mit demjenigen von 44 überein.
Die Beobachtung, daß Ascorbinsäure das chinoide System von 44 wieder zum Hydrochinon reduziert, ist für Stabilisierungsmaßnahmen von 43 bedeutsam. Nach Zusatz von äquimolaren Mengen Vitamin C bleibt das zuckerfreie Molekül bei Raumtemperatur in methanolischer Lösung auch in Gegenwart von Licht über Wochen stabil.

Mit der Herstellung von 44 war der Beweis eines Brenzcatechin-Systems in 43 bzw. 20 auch auf chemischem Weg zweifelsfrei erbracht.



44 51

2.7.1.3 Die Acetyl-Derivate von Fevicordin A-glucosid und Fevicordin A: 52 und 53

Acetylierungsversuche wurden unternommen, um eine Bestätigung der Anzahl freier OH-Gruppen zu erhalten. Mit Acetanhydrid/Pyridin [111] sollten sich beim Glucosid 6 und beim Aglykon 3 Acetat-Einheiten einführen lassen, da tertiäre OH-Gruppen (wie die an C-20) schwer acetylierbar sind.

Für 43 erhofften wir uns durch die Acetylierung der beiden phenolischen OH-Funktionen ein chemisch stabileres Derivat, da die veresterten OH-Funktionen einer Oxidation nicht mehr zugänglich sind.

Der Einfluß der O-Acetylierung sollte auf H-1 und die Kohlenstoffatome 1 und 4 des Ringes A in 52 und 53 verschieden sein.

NMR-spektroskopischer Vergleich konnte Hinweise geben über die noch nicht festgelegte Substitutionsstelle der glykosidischen Bindung.

Sowohl 20 als auch 43 lieferten einheitliche Acetylierungsprodukte.

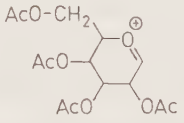
Die Reinigung von 53 (aus 43) an SiO_2 mit $CHCl_3$/Alkohol-Gemischen führte zu größeren Substanzverlusten; die aromatischen OH-Funktionen wurden offensichtlich zum Teil wieder freigesetzt, wie schon an der gelben Verfärbung des Kieselgels während der Chromatographie zu sehen war. Die Abspaltung der Acetylgruppen konnte verhindert werden beim Übergang auf Cyclohexan/Essigester- oder Toluol/Essigester-Systeme.

Andererseits war 52 auch mit $CHCl_3$/Methanol an SiO_2 ohne Veränderung chromatographierbar.

Massenspektren

Durch die Veresterung der Zucker-Hydroxylgruppen und zwei OH-Funktionen im Aglykon-Anteil von 20 ist 52 weniger polar und damit leichter verdampfbar.

52 zeigte jetzt im EI-MS den typischen Fragmentierungsweg für Tetraacetyl-Glucoside. Der Zerfall des acetylierten Zuckers beherrscht weitgehend das Erscheinungsbild des EI-MS [112,113]; Fragmente des Aglykons treten kaum auf. Dies kann darauf zurückgeführt werden, daß die positive Ladung nach Bruch der glykosidischen Bindung bevorzugt auf dem stabilisierten Oxonium-Ion 54 lokalisiert ist.



54 m/z 331

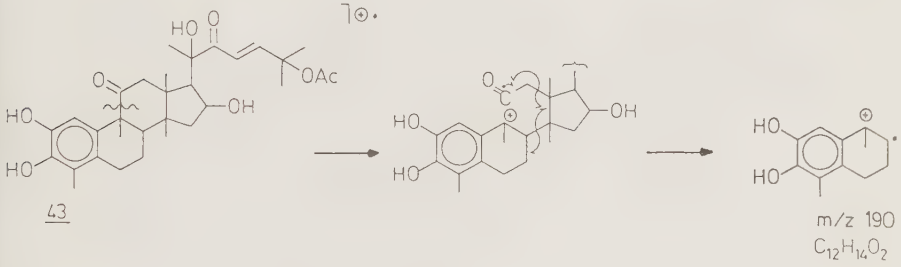
Das DCI-MS (NH_3) von 52 zeigt das Molekül-Anlagerungsion $[M + NH_4^+]$ bei m/z 974 als Base-Peak.

Das EI-MS von 53 weist als Ion höchster Masse m/z 608 $[M - \text{Essigsäure}^+]$ auf. Hochauflösung bestimmte die Zusammensetzung dieses Peaks mit $C_{35}H_{44}O_9$. Von besonderem Interesse war bei den hochaufgelösten MS-Messungen die Zusammensetzung des Fragmentes m/z 190, das in Fevicordin A-Spektren regelmäßig auftritt und von den Ionen bei m/z 189 und m/z 188 begleitet ist.

m/z 190 war bei den Massenspektren der Cucurbitacin-Reihe nicht beschrieben worden, so daß die Vermutung entstand, der aromatische

Ring A könne an der Bildung dieser Ionen charakteristisch beteiligt sein. Ermittelt wurde die Zusammensetzung $C_{12}H_{14}O_2$ entsprechend der Masse 190,09937.

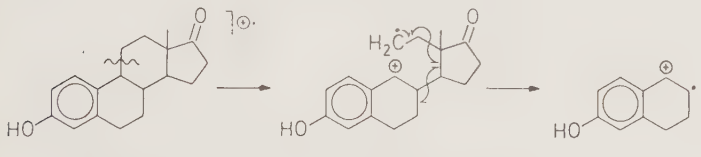
Aufgrund unserer Untersuchungen schlagen wir folgenden Zerfallsweg zu m/z 190 vor (Abb. 12):



43

Abb. 12: Entstehen des Fragmentes m/z 190 in 43

Es ist bekannt [114], daß Steroide mit aromatischem Ring A primär leicht in benzylischer Stellung gespalten werden, da dabei energetisch günstige Radikal-Kationen entstehen.
Beispielhaft sei der Zerfall von 3-Hydroxy-östra-1,3,5(10)-trien-17-on (36) angeführt, der folgendermaßen erklärt wird [114]:



36

Abb. 13: Entstehen des Fragmentes m/z 146 in 36

Daß im EI-MS von 53 die Fragmente m/z 190, 189, 188 und nicht 274 (190 + 2 x Acetat) auftreten, ist damit erklärbar, daß die phenolischen Acetatgruppen unter EI-MS-Bedingungen sehr leicht abgespalten werden, wobei unter H-Übertragung das oben vorgeschlagene Fragment entsteht.

^{13}C-NMR-Spektren

Der Einfluß einer O-Acetatgruppe im Aromaten auf die o- und p-Positionen ist sehr groß [87]. Die Metapositionen sind kaum betroffen, während das acetylierte C-Atom einen Hochfeld-Shift von etwa - 6 ppm erleidet. Die o-Positionen unterliegen einem Tieffeld-Shift in der gleichen Größenordnung; die p-Stellung wird um etwa +6 ppm nach tieferem Feld verschoben.

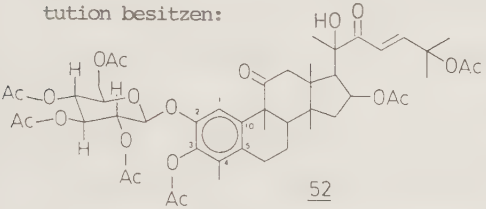
Der Berechnung von 52 und 53 (Tab. 17, S. 85) wurden die Shifts zu Grunde gelegt, die aus den Differenzen der ^{13}C-Resonanzlagen im Ring A zwischen einem 3-Hydroxy-östra-1,3,5(10)-trien und dessen Acetylierungsprodukt resultieren [88].

Ein Tieffeld-Shift von etwa 6 ppm des C-1 sollte sich im Zuge der Acetylierung für 52 ergeben, falls der Zucker gebunden an C-3 vorlag und damit eine freie OH-Gruppe an C-2 für die Acetylierung zugänglich wäre. Umgekehrt war ein geringerer Shift zu erwarten, wenn die glykosidische Bindung über C-2 verläuft, obwohl auch eine tetraacetylierte Glucose-Einheit die chemische Verschiebung von C-1 beeinflußt.

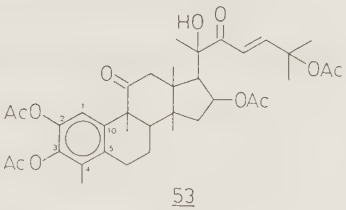
Wie aus Tabelle 17 ersichtlich, absorbiert C-1 in 52 bei 109.0 ppm, erfährt also durch die Acetylierung einen Hochfeld-Shift, während

C-1 in 53 bei 118,3 ppm in Resonanz tritt, also etwa 8 ppm tieferfeldig als in 43.

Daraus leiteten wir eine 2-O-β-glucosidische Bindung in 20 als weitere Arbeitshypothese ab. 52 und 53 sollten damit folgende Konstitution besitzen:



52



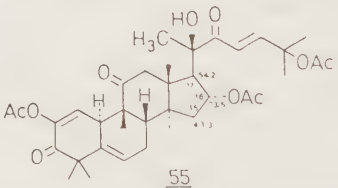
53

Tabelle 17 vergleicht die Resonanzlagen von 52 und 53, die auf Inkrementberechnungen [87,88] beruhen, mit den tatsächlich gefundenen Meßwerten im Bereich des Ringes A:

Tabelle 17: ^{13}C-NMR-Resonanzlagen von 52 und 53 im Ring A, im Vergleich zu 20 und 43

			C-1 δ [ppm]	C-2 δ [ppm]	C-3 δ [ppm]	C-4 δ [ppm]	C-5 δ [ppm]	C-10 δ [ppm]
(CD_3OD)	20	gemessen	113.2	144.4	144.0	124.4	130.9	129.5
	52	berechnet	113.2	150.4	138.0	130.4	130.9	135.8
($CDCl_3$)	52	gemessen	109.6	146.3	137.0	130.4	129.1	135.4
(C_6D_6)	43	gemessen	110.0	142.6	142.1	123.3	128.5	129.2
	53	berechnet	116.0	142.6	142.1	129.3	134.5	135.5
(C_6D_6)	53	gemessen	118.3	141.2	140.1	130.7	133.1	136.6

Die größten Abweichungen zwischen berechneten und gemessenen Werten waren für C-1 und C-2 in 52 festzustellen. Dies hängt damit zusammen, daß der Gluc(Ac)$_4$-Rest nicht in die Inkrementberechnung einbezogen wurde; die übrigen Signale zeigten sehr gute Übereinstimmung.
Ein Vergleich der Meßwerte mit den ^{13}C-Daten des 2,16-Diacetyl-Derivates von Cucurbitacin E (55) ergab sehr gute Übereinstimmung für alle C-Atome im Bereich der Ringe C und D, sowie der ungesättigten Seitenkette und erleichterte deren Zuordnung; so werden z.B. nach Acetylierung der C-16-OH-Gruppe die Resonanzsignale von C-15, C-16 und C-17 in charakteristischer Weise verschoben [78,79]. Die übrigen C-Atome in 52 und 53 weisen gleiche Resonanzlagen auf wie 20 bzw. 43.



55

Zusätzlich treten in den Spektren von 52 sechs und bei 53 drei Signale bei etwa 170 ppm (Ac-CO-) in Resonanz, im Vergleich zu den nicht acetylierten Verbindungen.
Auch alle Signallagen der tetraacetylierten β-Glucose-Einheit sind in hervorragender Übereinstimmung mit entsprechenden Literaturangaben [115,116].

^{1}H-NMR-Spektren

Acetylierte Glykoside zeichnen sich im Protonen-NMR-Spektrum durch einen weniger komplexen Absorptionsbereich der Carbinolprotonen aus (3 - 4.5 ppm). Oft wird erst dadurch eine Interpretation von Kopplungen

zwischen den Methinprotonen des Zuckers möglich und erlaubt eine eindeutige Aussage über die Konfiguration des Zuckers und der glykosidischen Bindung.

H-1' spaltet in 52 als Dublett bei typischer Resonanzlage für acetylierte β-Glucoside auf (δ=4.95 ppm, J=8 Hz). Auch die Signale der übrigen Zucker-Protonen stimmen sehr gut mit Literaturangaben überein [82,86].

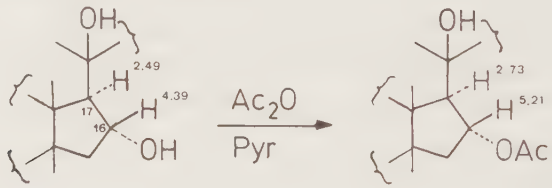
Ein als Singulett erscheinendes Signal im Spektrum von 52 bei 4.38 ppm ist austauschbar und belegt, daß eine (tertiäre) OH-Funktion nicht acetyliert worden war.

Dieser Befund steht in Einklang mit nur 6 "neu" hinzu gekommenen CH_3-Signalen im ^{1}H-NMR-Spektrum von 52, obwohl 20 7 freie OH-Gruppen im Molekül enthält. Von diesen 6 CH_3-Signalen treten 5 bei 1.85 - 2.06 ppm und eines 2.28 ppm in Resonanz. Entsprechend werden im Protonen-Spektrum von 53 drei eingeführte Acetat-Methylgruppen nachgewiesen, von denen zwei durch ihre Lage als Phenolester identifiziert werden konnten (δ=2.26 und 2.32 ppm).

Um auch noch die OH-Gruppe an C-20 zu acetylieren wurden verschiedene stärkere Acetylierungsverfahren erprobt: Die Methode nach Steglich [117] mit Acetanhydrid und 4-Dimethylaminopyridin führte bei 43 zu völliger Zersetzung, bei 20 zu einem Substanzgemisch, bei dem kein Produkt auftrat, das im DC einen zu erwartenden höheren Rf-Wert aufwies als 52. Weitere Acetylierungsmethoden, wie das Verfahren nach Ohloff mit Acetylchlorid und Dimethylanilin [118] oder die Acetylierung mittels Acetanhydrid und BF_3-Etherat [119] führten ebenfalls nicht zur Veresterung der C-20-OH-Funktion. Daraus wurde geschlossen, daß die tertiäre C-20-OH-Funktion in Nachbarschaft zur Carbonylfunktion 22

sterisch zu ungünstig für einen Angriff des acetylierenden Agens liegt.

Der Vergleich der Meßwerte mit den ^{1}H-NMR-Daten des 2,16-Diacetyl-Derivats von Cucurbitacin E (55) ergab sehr gute Übereinstimmung für die Resonanzlagen von H-16 und H-17, sowohl in der Richtung, als auch in der Größenordnung der Shifts.



21 55

2.7.1.4 Methylierungs-Derivate

2.7.1.4.1 Fevicordin A-glucosid-monomethylether (56) und Fevicordin A-dimethylether (57)

Da sich wegen der leichten Hydrolyse acetyliertes Fevicordin A als kein allzu stabiles Aglykon-Derivat erwiesen hatte, wurden die Methylether 56 und 57 hergestellt. Methylierungsversuche mit Diazomethan führten bei 43 zu Produktgemischen. Dagegen verlief die Methylierung mit CH_3J und geglühtem K_2CO_3 in absolutem Aceton bei Raumtemperatur sowohl von 20 als auch von 43 in befriedigenden Ausbeuten zu 56 und 57.

UV-Spektren

Die UV-Spektren von 56 und 57 sind denen von 20 bzw. 43 sehr ähnlich. Bei Zugeben von NaOH ergibt sich weder bei 56, noch bei 57 ein bathochromer Effekt.

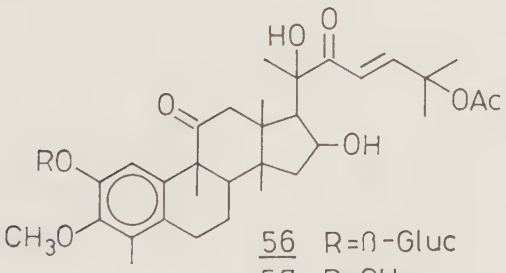
Dies zeigt, daß beide phenolischen OH-Gruppen verethert vorliegen und im Gegensatz zu den entsprechenden Acetylestern in 52 und 53 alkalistabil sind.

Massenspektren

Im DCI (NH_3) von 56 konnte das Anlagerungsion $[M + NH_4^+]$ bei m/z 736 nachgewiesen werden. Damit wurde demonstriert, daß unter den angewandten Bedingungen tatsächlich nur eine CH_3-Gruppe eingeführt wird.

57 weist im EI-MS das Molekülion bei m/z 570 auf.

Signifikante Fragmente bei m/z 217 und 218 und das "Fehlen" von Ionen bei m/z 189 und 190 entsprachen voll dem Zerfallsweg, der für das Entstehen von m/z 190 ($C_{12}H_{14}O_2$) vorgeschlagen worden ist (siehe Abschnitt 2.7.1.3, Abb. 12, S. 83).



56 R=ß-Gluc
57 R=CH_3

NMR-Spektren

Die ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren bestätigten erneut: 56 enthält eine, 57 zwei Methoxy-Gruppen.

Erwähnenswert scheint an dieser Stelle wieder zunächst der Vergleich des C-1 in den ^{13}C-NMR-Spektren von 56 und 57. Während C-1 im Monomethoxy-Glucosid 56 keinen Shift erfährt, beobachtet man beim Dimethoxy-Aglykon 57 eine C-1-Hochfeld-Verschiebung um -1.6 ppm. Dies entspricht wiederum der Glykosidierung an C-2.

Im allgemeinen sind die Einflüsse der Methylierung von Phenolen auf die ^{13}C-Resonanzen der Ring-A-Atome nur gering (s. Tab. 8, S. 47, Verbindungen: 36 und 41). Für die C-Atome 2,3,4 und 5 ergaben sich bei 56 und 57 jedoch deutlich größere Shifts als erwartet (s. Tab. 18, S. 92). C-4, das in 20 und 43 bei etwa 124 ppm erscheint, war nicht mehr zuzuordnen.

Bei hochsubstituierten Aromaten spielen auch Wechselwirkungen zwischen den Substituenten eine Rolle, so daß die Inkremente, die an und für sich nur bei geringer Substitution gültig sind, eine zutreffende Voraussage über die Lage der einzelnen Resonanzsignale nicht immer ermöglichen. ^{13}C-NMR-Daten für ein 2,3-Dimethoxy-4-methyl-östra-1,3,5(10)-trien waren in der Literatur nicht beschrieben. Auch die Suche nach NMR-Daten eines entsprechend substituierten Tetralin-Derivates blieb erfolglos. Wir haben daher in Anlehnung an eine Literaturvorschrift von Momose und Goya [120] 2,3-Dimethoxy-1-methyl-tetralin synthetisiert und ^{13}C-NMR-spektroskopisch untersucht.

2.7.1.4.2 Synthese von 2,3-Dimethoxy-1-methyl-tetralin

Als Ausgangspunkt wurde käufliches 6,7-Dimethoxy-tetralon-(2) (58) eingesetzt. Folgender Syntheseweg war geplant (Abb. 14):

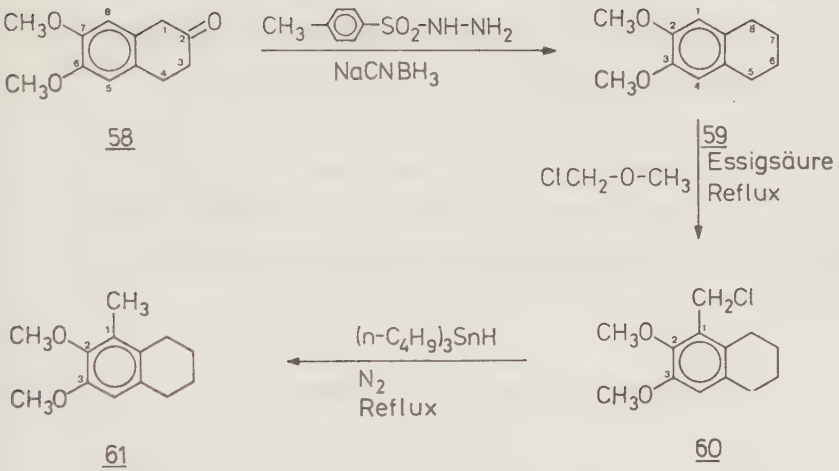


Abb. 14: Syntheseweg von 2,3-Dimethoxy-1-methyl-tetralin (61)

Der Umgang mit β-Tetralonen ist in der Literatur als problematisch beschrieben. Vor allem methoxyl-substituierte β-Tetralone wie 58 zersetzen sich schon bei Raumtemperatur innerhalb kurzer Zeit [121]. Vorversuche bestätigten diese Angaben. Da die Methylengruppe an C-1 in benzylischer Position, α-ständig zur C-2-Carbonyl-Funktion, eine besonders reaktive Gruppierung darstellte, war es daher sinnvoll im ersten Reaktionsschritt die Reaktivität der Verbindung herabzusetzen, indem man die Keto-Gruppe entfernte. Die Umsetzung von 58 mit p-Toluolsulfonsäurehydrazid im leicht sauren Medium und anschließender Reduktion mit $NaBH_3CN$ [122] zu 59 verlief weitgehend befriedigend. Nach Isolierung dieses Zwischenproduktes 59 wurde eine Substitution des Aromaten mit Chlormethylmethylether in Gegenwart von Eisessig [123] durchgeführt.

Auch diese Reaktion führte zu einem Hauptprodukt 60. Die Dehalogenierung mit $(C_4H_9)_3SnH$ [124] erfolgte unter N_2-Atmosphäre problemlos und lieferte das gewünschte Endprodukt: 2,3-Dimethoxy-1-methyltetralin (61).

Wie die Gegenüberstellung der ^{13}C-NMR-Resonanzen der aromatischen Ringsysteme von 61 und Fevicordin A-dimethylether (57) verdeutlicht, mußte das Substitutionsmuster in beiden Verbindungen gleich sein (Tab. 18).

Tabelle 18: ^{13}C-NMR-Resonanzlagen von 56, 57 und 61 im aromatischen Ring

	δ[ppm]	δ[ppm]	δ[ppm]	δ[ppm]	δ[ppm]	δ[ppm]	δ[ppm]	δ[ppm]
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-10	OCH_3/C-2	OCH_3/C-3
(CD_3COCD_3) 56	113.5	148.8*	147.2*	130.0**	130.8**	134.3	-	60.9
$(CDCl_3)$ 57	107.1	150.4	145.8	130.8	127.1	133.3	55.9	60.4
$(CDCl_3)$ 61	C-4	C-3	C-2	C-1	C-8a	C-4a	OCH_3/C-3	OCH_3/C-2
	110.6	150.4	145.5	130.2	128.3	132.4	55.8	60.3

*) **) Zuordnungen gegebenenfalls umgekehrt.

Anmerkung: Positionsnummern differieren.

Die eindeutige Bestätigung der in Tabelle 18 für 57 getroffenen Signal-Zuordnungen konnte durch ein $^{13}C\{^1H\}$-Shift korreliertes 2D-NMR-Spektrum (long range) erhalten werden (Abb. 15, S. 94).

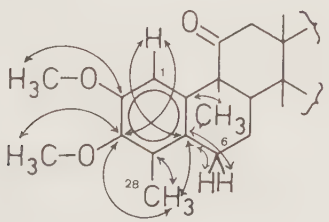
In Tabelle 19 (S.93) werden die Kopplungen aufgeführt, die der endgültigen Festlegung der fraglichen Resonanzlagen im Ring A dienten.

Die Zuordnung der OCH_3-Signale (55.8 bzw. 60.3 ppm) in 61 und 57 wurde

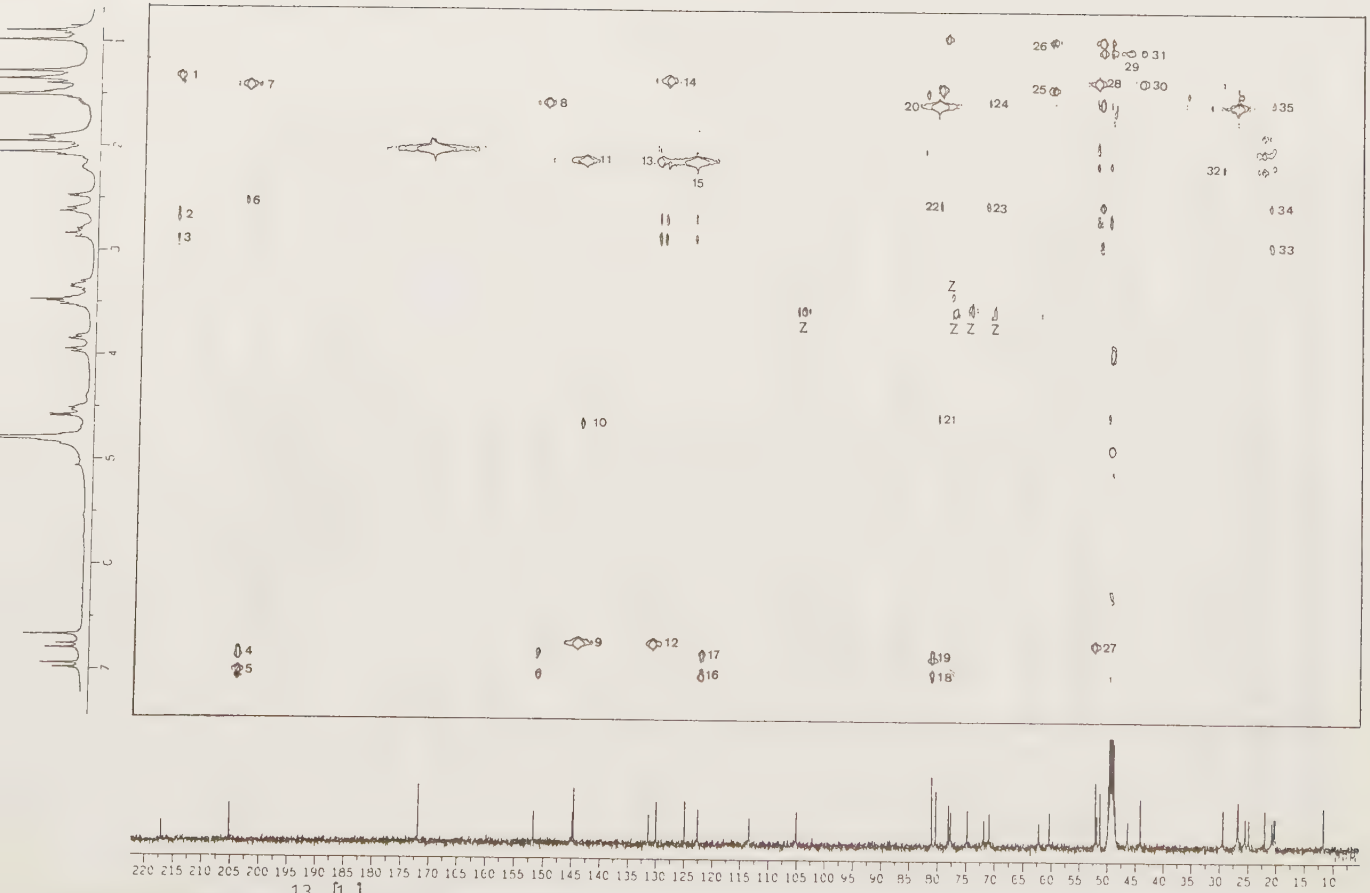
durch Korrelation mit den ^{13}C-NMR-Daten des Alkaloids Oxoepistephamierisin (62) aus Stephania japonica getroffen [125]. Die ^{13}C-NMR-Resonanzlagen von 62 im Bereich des aromatischen Ringes sind in Tabelle 20 (S.95) angegeben.

Tabelle 19: Kopplungssysteme im $^{13}C\{^{1}H\}$-Shift korrelierten 2D-NMR-Spektrum (long range) von 57 ($CDCl_3$)

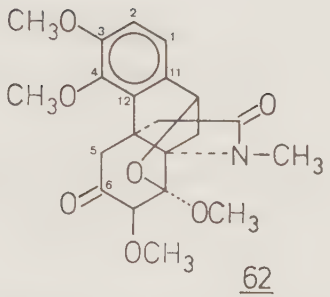
Kopplung	1:	^{2}J-H-1	mit C-2
"	2:	^{3}J-H-1	" C-3
"	3:	^{3}J-O$\underline{CH_3}$/C-2	" C-2
"	4:	^{3}J-O$\underline{CH_3}$/C-3	" C-3
"	5:	^{3}J-$\underline{CH_3}$-28	" C-3
"	6:	^{3}J-$\underline{CH_3}$-19	" C-10
"	7:	^{2}J-$\underline{CH_3}$-28	" C-4
"	8:	^{3}J-$\underline{CH_3}$-28	" C-5
"	9:	^{2}J-H-6_A	" C-5
"	10:	^{2}J-H-6_B	" C-5
"	11:	^{3}J-H-1	" C-5



57



b. 15: Konturdiagramm des $^{13}C\{^1H\}$-Shift korrelierten
2-D-NMR-Spektrums von 57 ($CDCl_3$) (Die auftretenden Kopplungssysteme sind in Tab. 19 beschrieben)



62

Tabelle 20: ^{13}C-NMR-Resonanzlagen von 62 im Bereich des aromatischen Ringes [125] ($CDCl_3$)

C-1 δ[ppm]	C-2 δ[ppm]	C-3 δ[ppm]	C-4 δ[ppm]	C-12 δ[ppm]	C-11 δ[ppm]	OCH_3/C-3 δ[ppm]	OCH_3/C-4 δ[ppm]
120.4	111.4	153.3	148.4	129.2	133.6	55.9	60.5

2.7.1.5 Herstellung von Fevicordin A-formaldehydacetal (63)

Die klassische Methode Benzo-1,3-dioxol (=Methylendioxy-benzol) herzustellen, ist die der Umsetzung von Brenzcatechin mit CH_2J_2 in Gegenwart von methanolischer NaOH [126].

Literaturbekannte Variationen bestehen in der Änderung der Base, des alkylierenden Agens und/oder des Lösungsmittels [127].

Auch Zusätze von Bronze, Kupferoxid oder Nickeloxid werden zur Verbesserung der meist nur geringen Ausbeuten empfohlen [128,129].

Anwendung der Phasentransferkatalyse [130-132] ist eine weitere Modifikation der oben genannten Basis-Reaktion. Man arbeitet in

einem Zwei-Phasen-System, das aus der wässrigen Lösung eines quartären Ammoniumhydroxyds und Methylenchlorid als alkylierendem Agens besteht.

Die "klassische" Methode und die Phasentransferkatalyse wurden erprobt, führten aber bei 43 nicht zum gewünschten Erfolg. Es entstand eine Vielzahl von Produkten. Auch ein gezieltes Isolieren von "Methylendioxy"-Fevicordin A (63) war aus den Produktgemischen in passabler Ausbeute nicht möglich. Als Ursache für die Zersetzungserscheinungen vermuten wir die Labilität von 43 in alkalischer Lösung. Auch bei Cucurbitacinen wird beschrieben, daß Zusatz von NaOH eine Reihe irreversibler Reaktionen in Gang setzt. Der Angriff erfolgt unter anderem am α,β-ungesättigten Carbonylsystem der Seitenkette und führt zu deren Spaltung [133-136].

Stabilitätstests mit 43 zeigten, daß wässrige alkalische Lösungen schnell zur Zersetzung führen, ebenso Kaliumcarbonat in warmer alkoholischer Lösung. In wasserfreiem Aceton dagegen, unter Zusatz von K_2CO_3 war nur eine geringfügige Bildung von Nebenprodukten festzustellen. Es gelang jedoch nicht, die CH_2-Brücke in Analogie zur Methylierungsreaktion durch Umsatz mit CH_2Br_2 in absolutem Aceton einzuführen (K_2CO_3,RT): 43 wurde unverändert zurückgewonnen.

Erfolgreich war die CsF-Methode [137,138]: CsF ist auch in dipolaren aprotischen Lösungsmitteln (z.B. DMF) gut dissoziierbar. Es wird im Überschuß verwendet, wobei sich der Alkylierungsvorgang als "S_N2"-Reaktion an der Oberfläche des großen Cs-Kations abspielen soll (Ionenradius 1.65 Å; der Ionenradius von Na^+ beträgt demgegenüber 0.98 Å). Man diskutiert die intermediäre Bildung eines Dicäsium-Salzes,

wobei die Phenolat-Anionen nucleophil die beiden Halogenatome aus dem alkylierenden Agens verdrängen.

Folgende schematische Abbildung (Abb. 16) soll dies verdeutlichen [138]:

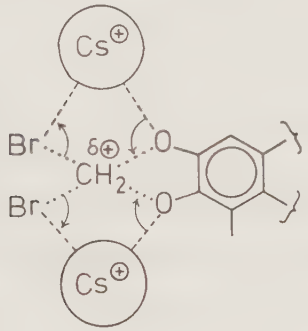
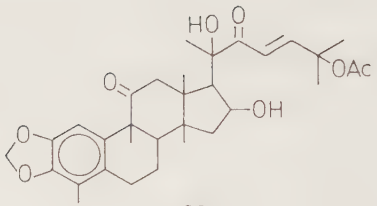


Abb. 16: Intramolekularer Ringschluß an der Oberfläche des Caesium-Kations (C-O-Bindungsknüpfung)

Wichtig für einen derartigen Reaktionsablauf ist, daß Cs-Salze gut polarisierbar sind und wegen ihres großen Ionenradius auch weniger solvatisiert werden als kleinere Kationen [138]. Dadurch wird ihre Basizität größer. Die Protonenacceptorrolle übernimmt das elektronenreiche und damit sehr nukleophile F-Anion.

Die Reaktion erfordert absoluten Ausschluß von Wasser [137,139].

Unter Herabsetzung der nach Literatur empfohlenen Reaktionstemperatur[137] von 115° C, bei der nur sehr geringe Mengen an 63 anfielen (5-7 %), auf maximal 30° C, gelang es, 63 in 28 % Ausbeute nach chromatographischer Reinigung zu erhalten.



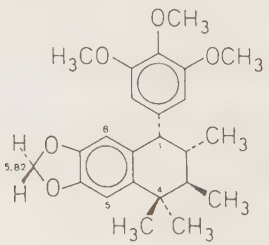
63

Spektroskopische Untersuchungen an 63:

Als Ion höchster Masse erscheint im EI-MS bei m/z 554 ein signifikantes Molekülion. Weitere wesentliche Fragmente sind m/z 494 (M^+-Essigsäure). Unter Verlust der Seitenkette entsteht m/z 398 (M^+-Essigsäure - 96 Masseneinheiten).

Schlüsselfragment für den aromatischen Ring A ist die Masse bei m/z 202, anstelle von m/z 190 in 43 (siehe Abschnitt 2.7.1.3, Abb. 12, S. 83).

Auch die NMR-spektroskopischen Daten sind mit 63 in Übereinstimmung. Im ^{1}H-NMR-Spektrum von 63 ($CDCl_3$) treten die geminalen Protonen der Methylendioxy-Gruppe bei typischer Resonanzlage und charakteristischem Kopplungsmuster [87] auf (δ = 5.88 ppm, d, 2 H, J = 1.4 Hz). Diese Daten sind in sehr guter Übereinstimmung mit Literaturwerten für Verbindungen mit Methylendioxy-Gruppierung, wie z.B. dem Australobailignan-4 (64) [140].



64

Auch im ^{13}C-NMR-Spektrum wird die Anwesenheit der Methylendioxy-Gruppe in 63 durch die typische Signallage bei 100.3 ppm [87] bewiesen.

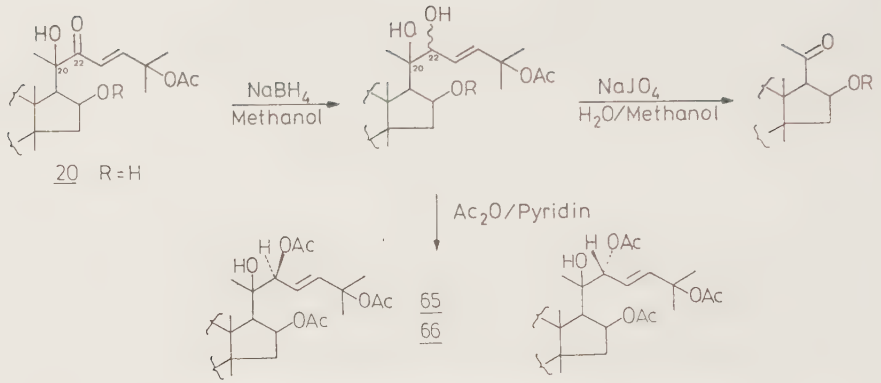
2.7.2 Abbau von Fevicordin-A-glucosid - bzw. Fevicordin-A-Derivaten - Festlegung der ungesättigten Seitenkette

2.7.2.1 Herstellung der 22-Hydroxy-Verbindungen durch Reduktion mit $NaBH_4$

Nach den ausführlichen spektroskopischen Untersuchungen sollte die strukturelle Ähnlichkeit von Fevicordin A-glucosid (20) und Cucurbitacin E (21) im Bereich der Ringe C, D und der Seitenkette auf chemischem Weg weiter erhärtet werden. Insbesondere mußte noch bewiesen werden, daß die im Molekül vorhandene Acetatgruppe im Bereich der ungesättigten Seitenkette tatsächlich an der C-25-OH- und nicht etwa an der C-20-OH-Funktion gebunden vorlag.

Zu diesem Zweck sollte die Seitenkette zwischen C-21 und C-22 mit Natriumperjodat oxidativ gespalten werden [141-143] und mit entsprechenden seitenkettenverkürzten Cucurbitacin-Derivaten spektroskopisch verglichen werden.

Folgende Reaktionsfolge zur selektiven Spaltung in der Seitenkette war geplant (Abb. 17):



20 R = H

Abb. 17: Abbau der Seitenkette in 20 und in Derivaten von 20

Die selektive Reduktion der C-22-Ketofunktion (unter Erhalt der C-11-Ketofunktion) bereitete keine Schwierigkeiten, da C-11 sterisch sehr stark gehindert und dem Reduktionsmittel nur schwer zugänglich ist [144].

Die Reduktion der Keto-Gruppe an C-22 gelang unter schonenden Bedingungen mit $NaBH_4$ in methanolischer Lösung bei Raumtemperatur [144]. Es entstand ein DC-einheitliches Hauptprodukt, das sich säulenchromatographisch nicht in Epimere trennen ließ. Die Trennung der diastereomeren 22-ole gelang über die Heptaacetate 65 und 66 (siehe Abb. 17). Für den weiteren Verlauf der Seitenkettenverkürzung war die Trennung jedoch nicht erforderlich, da auch das Gemisch der diastereomeren 22-ole zur Perjodat-Spaltung eingesetzt werden konnte.

2.7.2.2 Abbau von Fevicordin A zu 16-Acetoxy-2,3-dimethoxy-4,9,14-trimethyl-19,29-bisnorpregna-1,3,5(10)-trien-11,20-dion (68)

Die Diolspaltung mit $NaJO_4$ verläuft unter Bildung eines cyclischen Übergangszustandes. Es bilden sich durch Oxidation zwei Carbonylverbindungen pro Diol-Einheit, unter Reduktion des Perjodates zu Jodat [145] (Abb. 18).

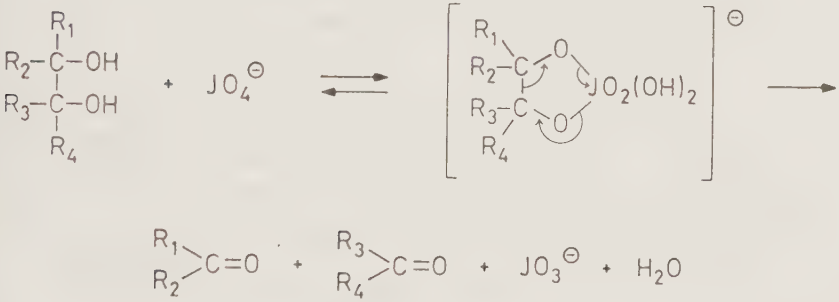


Abb. 18: Reaktionsablauf bei der oxidativen Diol-Spaltung mit $NaJO_4$

Vor der oxidativen Spaltung des 20-22-Diols mußte beim Einsatz des Aglykons die empfindliche Brenzcatechin-Struktur geschützt werden. Im sauren Milieu war auch ein Verlust der 16-OH-Gruppe durch Dehydratisierung zu befürchten, unter Entstehen einer Doppelbindung in Konjugation zur erwarteten C-20-Ketogruppe. Daher mußte auch diese Gruppe geschützt werden. Wir haben daher Fevicordin A dimethyliert zu 57 (s. S. 89) und anschließend die 16-OH-Funktion acetyliert zu Verbindung 67: 16-Acetoxy-2,3-dimethoxy-fevicordin A. 67 wurde dann

ohne weitere Zwischenreinigung mit $NaBH_4$ reduziert und nach chromatographischer Abtrennung des überschüssigen Hydrides bei den diastereomeren Produkten die 20-22-Diolspaltung mit $NaJO_4$ zu 68 durchgeführt (Siehe Abb. 19). Das relativ unpolare Produkt wurde chromatographisch gereinigt und spektroskopisch untersucht; die Ergebnisse bestätigten voll Struktur 68.

Der Ablauf der Perjodat-Spaltung setzt unter den gegebenen Bedingungen eine freie Hydroxyl-Gruppe an C-20 voraus. Somit bestätigte der erfolgreiche Verlauf der Reaktion das Strukturelement 25 (s. S. 37) mit einer Acetylfunktion an C-25.

Daß die Essigsäureester-Gruppe nicht beim Reaktionsverlauf gespalten wird (K_2CO_3,$NaBH_4$) wurde durch spektroskopische Untersuchung der diastereomeren Verbindungen 65 und 66 (S. Abb. 17, S. 100) bewiesen. Diese enthalten im Vergleich zu Fevicordin A-glucosid-hexaacetat (52) je eine Acetateinheit mehr im Molekül (siehe experimenteller Teil).

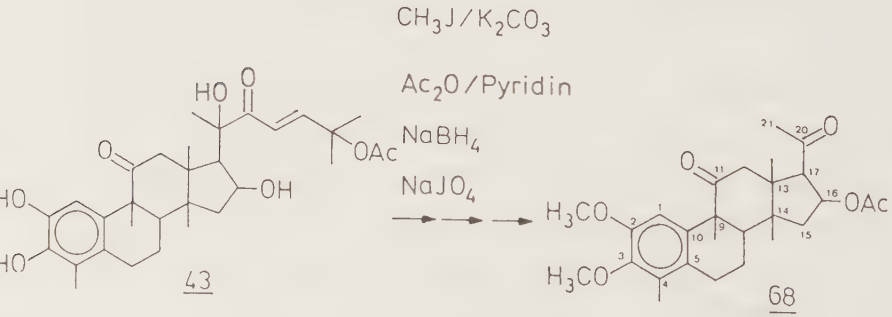
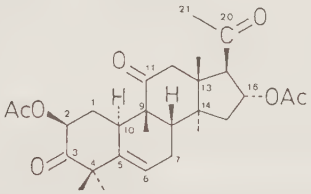


Abb. 19: Abbau von Fevicordin A zu Verbindung 68

In Anlehnung an das abgebaute Cucurbitacin-Derivat (2β,9β, 10α, 16α)-2,16-Diacetoxy-4,4,9,14-tetramethyl-19-norpregn-5-en-3,11,20-trion (69) [79] wollen wir Verbindung 68 als 16-Acetoxy-2,3-dimethoxy-4,9,14-trimethyl-19,29-bisnorpregna-1,3,5(10)-trien-11,20-dion benennen.



69

NMR-Spektroskopische Befunde

Durch die Verkürzung der Seitenkette ergaben sich einige wesentliche Verbesserungen für die NMR-Spektroskopie. Wegen der geringen Polarität löste sich 68 sehr gut in $CDCl_3$, es traten keinerlei Assoziationserscheinungen mehr auf, und es ergaben sich weniger Signal-Überschneidungen.

So konnte z.B. $H\text{-}15_A$ jetzt bei 1.60 ppm gut als Dublett (J=15 Hz) erkannt werden. Darüberhinaus waren die Protonenresonanzen in 68 mit den entsprechenden Literaturdaten von 69 [78] sehr gut zu korrelieren. Auch der Vergleich der ^{13}C-NMR-Resonanzlagen von 68 mit den Daten von 69 [79] zeigte volle Übereinstimmung für die Signale, im Bereich der Ringe C und D.

2.7.3 Derivate zur Festlegung der glykosidischen Bindung in Fevicordin A-glucosid (20)

2.7.3.1 Abbau von Fevicordin-A-glucosid-monomethylether (56) zu 2-Hydroxy-3-methoxy-4,9,14-trimethyl-19,29-bisnorpregna-1,3,5(10),16-tetraen-11,20-dion (70) und dessen Acetylierungsprodukt (71)

Bei der Acetylierung von Fevicordin A-glucosid zum Hexaacetat 52 und von Fevicordin A zum Triacetat 53 war aufgefallen, daß sich diese Derivatisierung auf C-1 im ^{13}C-NMR-Spektrum sehr verschieden auswirkt. Während z.B. in 52 C-1 einen Hochfeld-Shift von etwa -4 ppm erfährt, ist für C-1 in 53 ein Tieffeld-Shift von etwa +8 ppm festzustellen (Siehe Tabelle 17, S. 85). Da der Einfluß der Acetylfunktionen, die im Zuge der Acetylierung auch an der Glucose eingeführt werden, auf C-1 nicht abgeschätzt werden konnte, sollte ein Fevicordin-A-glucosid-monomethylether (56) hergestellt und anschließend der Zuckeranteil abgespalten werden.

Die OH-Funktion, über die in 20 bzw. 56 die glykosidische Bindung verläuft, müßte auf C-1 dann denselben Einfluß ausüben, wie er bei 53 beobachtet worden war, wenn die OH-Gruppe an C-2 acetyliert würde. Versuche, die glykosidische Bindung nach der Methylierung enzymatisch zu spalten, blieben erfolglos.

Da die Spaltung durch Säurehydrolyse zu einer Vielzahl von Produkten führte, mußte nach einer anderen Möglichkeit der Zuckerabspaltung aus 56 gesucht werden. Hierfür bot sich der oxidative Abbau von 56 durch Perjodat-Spaltung [141,142,145] an, die schon beim Abbau der

Seitenkette von 20 angewendet wurde. Dabei werden primär zwei Bindungen gespalten (Abb. 20):

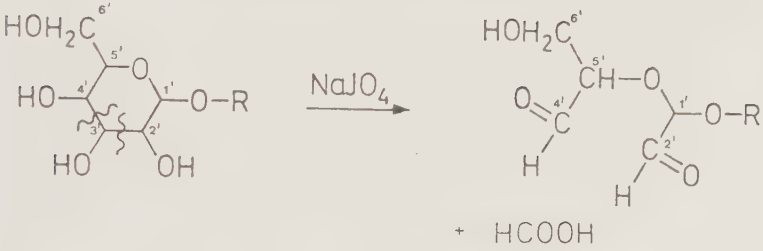


Abb. 20: Oxidativer Abbau des Zuckeranteils in Glykosiden

Das größere Spaltprodukt kann formal als "gemischtes" Acetal eines Oxaldialdehydes aufgefaßt werden, das bei saurer Hydrolyse in das Aglykon R-OH, den Aldehyd und eine weitere Alkoholkomponente aus den C-Atomen 4', 5' und 6' des Zuckers zerfällt.

Nach Reduktion der Ketofunktion an C-22 in Fevicordin-A-glucosid-monomethylether (56) mit $NaBH_4$ führten wir die oxidative Perjodat-spaltung durch (siehe 2.7.2.1 und 2.7.2.2). Im Zuge des Abbaues der Seitenkette wurde gleichzeitig der Glucose-Anteil aufgespalten und durch saure Hydrolyse das gewünschte monomethoxylierte Aglykon-Derivat 70 erhalten (Abb. 21).

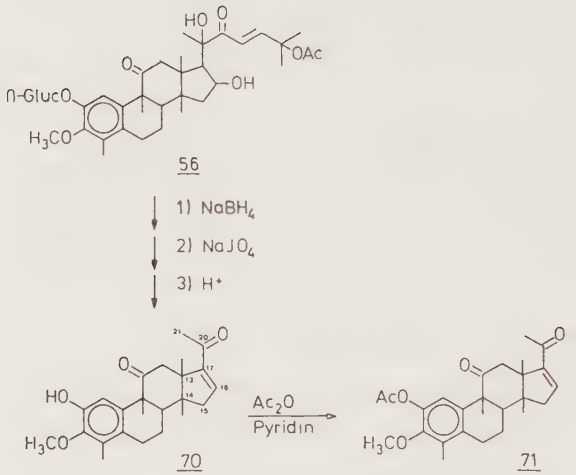


Abb. 21: Abbau von 56 zu 70 und 71

Da vor der Spaltung in diesem Fall die C-16-OH-Funktion nicht durch Acetylierung geschützt werden konnte, nahm man eine Dehydratisierung zur Δ^{16}-Verbindung in Kauf. Einen Teil des durch saure Hydrolyse gewonnenen Produktes 70 acetylierte man zu 71. Beide Verbindungen wurden spektroskopisch untersucht.

NMR-spektroskopische Befunde

Durch die "neue" Doppelbindung zwischen C-16 und C-17 tritt in den ^{1}H-NMR-Spektren beider Substanzen ein Signal bei 6.70 ppm (H-16,dd, J_1=4, J_2=2Hz) auf.

Im Vergleich zum ^{1}H-NMR-Spektrum von 70 beobachtet man in 71 bei sonst identischen Resonanzlagen eine phenolische Acetatgruppe bei

2.30 ppm. H-1 erfährt durch die Acetylierung der C-2-OH-Gruppe einen kleinen Tieffeld-Shift von +0.12 ppm (Abb. 22).

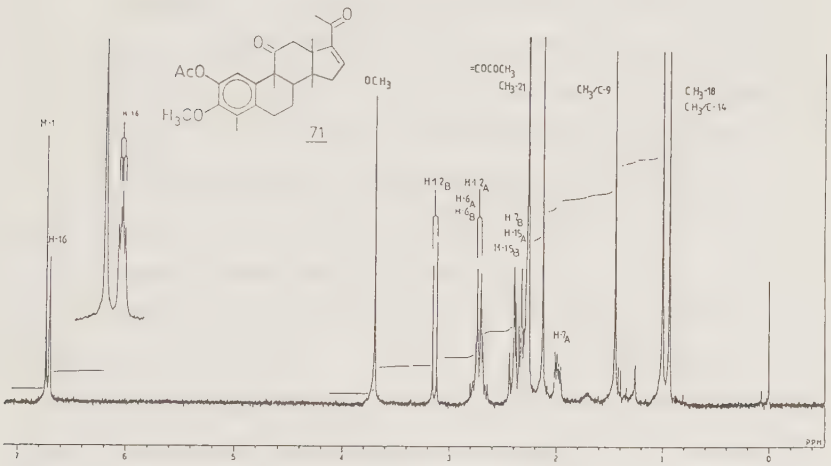
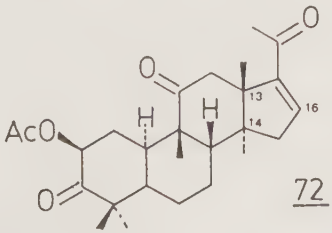


Abb. 22: ^{1}H-NMR-Spektrum von 71 ($CDCl_3$, 400 MHz)

Die ^{13}C-NMR-Spektren der Verbindungen 70 und 71 ähneln sich im höheren und mittleren Verschiebungsbereich sehr. Die Meßwerte von 70 und 71 stimmen mit den ^{13}C-Daten des 16,17-Dehydro-cucurbitacin-Derivates 72 [79] im Bereich der Ringe C und D voll überein.



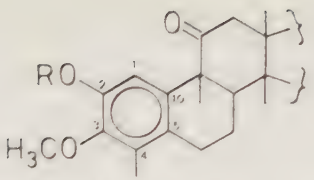
72

Interessant ist vor allem der Tieffeld-Shift um etwa +1.6 ppm, der sich für das C-Atom 13 (δ=52.6 ppm) sowohl in 70 bzw. 71, als auch im abgebauten Cucurbitacin-Derivat 72 ergibt, und durch eine fehlende γ-gauche-Wechselwirkung nach Verlust der 16-OH-Gruppe erklärt werden kann. Daraus läßt sich arbeitshypothetisch eine sterische Anordnung des Fevicordin-Grundgerüstes im Bereich der Ringe C und D ableiten, die derjenigen von Cucurbitacinen entspricht. Da das Signal bei 49.3 ppm in 20 bzw. 70 und 71 kaum einem Shift unterliegt, wurde dieses C-14 zugeordnet, wegen seiner größeren Konstanz bei der chemischen Veränderung bezüglich der Seitenkette, während die Resonanz 50.9 ppm in 20 (C-13) Abwandlungen gegenüber nicht beständig ist.

Andererseits treten Shifts bei den sp^2-hybridisierten Kohlenstoffen auf. Dies war auf die veränderte Ladungsdichte im aromatischen System zurückzuführen. Wie erwartet trat C-1 bei 71 um etwa 7.5 ppm nach tieferem Feld verschoben als bei 70 in Resonanz. Damit war die glykosidische Bindung an C-2 in 20 zweifelsfrei bestätigt. Tabelle 21 gibt die Signallagen der C-Atome aus dem aromatischen Bereich der Verbindungen 57, 70 und 71 wieder.

Tabelle 21: ^{13}C-NMR-Resonanzlagen von 57, 70 und 71 im Ring A ($CDCl_3$):

C-Atom	C-1 δ[ppm]	C-2 δ[ppm]	C-3 δ[ppm]	C-4 δ[ppm]	C-5 δ[ppm]	C-10 δ[ppm]
57	107.1	150.4	145.8	130.8	127.1	133.3
70	110.6	146.6	146.0	129.3	126.3	135.0
71	118.2	141.6	148.2	130.8	133.0	134.5



57 R=CH_3
70 R=H
71 R=Ac

Durch Acetylierung ergibt sich, wie schon erwähnt, gewöhnlich für das betroffene phenolische C-Atom eine diamagnetische Verschiebung von -4 bis 6 ppm. Die benachbarten o-Positionen werden dagegen in etwa der gleichen Größenordnung nach tieferem Feld verschoben, ebenso das paraständige C-Atom (s. Abschnitt 2.7.1.4, S. 84) [87].

Methylierung läßt das phenolische C-Atom bei etwa +3 ppm tieferem Feld [87] in Resonanz treten.

Diesen Inkrementen wurden bei der Zuordnung der Ring A - C-Atome von 70 und 71 Rechnung getragen:

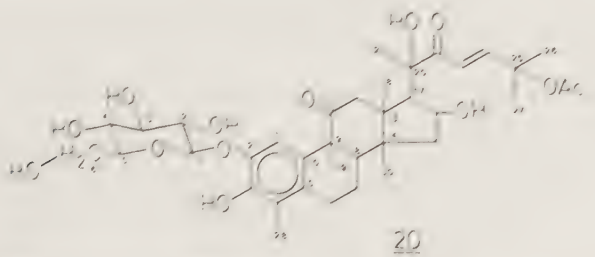
Methylierung von 70 zur Verbindung 57:

C-1: -3,5 ppm C-2: +3.8 ppm C-3: +1.8 ppm

Acetylierung von 70 zur Verbindung 71:

C-1: + 7.6 ppm C-2: -5.0 ppm C-3: +4.2 ppm C-5: +6.7 ppm

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Derivatisierungen, die in Abschnitt 2.7 besprochen wurden, Strukturvorschlag 33 a (S. 40 ff.) voll bestätigten und Verbindung 20 endgültig als das Pericoordin-A-2-O-β-D-glucosid festlegten.*)



20

*) Pericoordin A-2-O-β-D-glucosid wird im Text vereinfacht Pericoordin A-glucosid genannt.

2.8 Strukturermittlung von Nebenkomponenten

2.8.1 Fevicordin B-glucosid (73)

Wie in Abschnitt 2.4 erwähnt, fällt Fevicordin A-glucosid (20) im Zuge der Aufarbeitung zusammen mit einer zweiten Verbindung an, wenn die Chromatographie über Kieselgel mit $CHCl_3$-Methanol (9/1) erfolgt. Durch mehrfaches Umkristallisieren kann 20 rein erhalten werden.

In der Mutterlauge reichert sich dabei die Nebenverbindung 73 an: sie wurde daraus durch Chromatographie über PVA 500 mit 0.1 N-$AgNO_3$ - Aceton (75/25) isoliert und konnte kristallin, aus Fraktion D-1.2.ML.3 erhalten werden.

Das Elektronenspektrum gab den ersten Hinweis auf die Art der Strukturmodifikation: Während das Maximum bei 286 nm nach Wellenlänge und Intensität mit 20 vergleichbar ist, weist das längerwellige Maximum (bei 228 nm) eine signifikante Verringerung des Extinktionswertes auf. Offensichtlich war in 73 der entsprechende Chromophor, die α,β-ungesättigte Carbonylfunktion, nicht vorhanden.

Das EI-MS weist als Ion höchster Masse m/z 484 auf, also zwei Masseneinheiten mehr, als das entsprechende EI-MS von 20. Diese Befunde und die Ergebnisse der ^{1}H-NMR- und ^{13}C-NMR-Spektren (S. Tabelle 22, S. 111 und Tabelle 23, S. 112) legten nahe, daß es sich bei 73 um das 23,24-Dihydro-fevicordin A-glucosid handelte. Bestätigt wurde dies durch die Überführung von Fevicordin-A-glucosid (20) in 73 mittels katalytischer Hydrierung am Pd/Kohle-Kontakt (Abb. 23, S. 113).

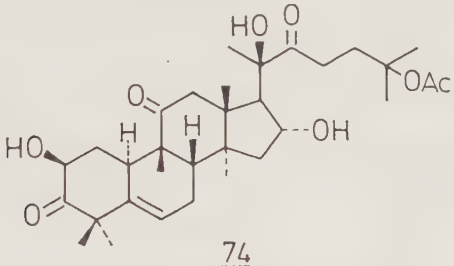
Tabelle 22: ^{13}C-NMR-Resonanzlagen der Nebenglucoside 73, 77 und 78 (CD_3OD; 22,5 MHz)

C-Atom	73 δ[ppm]	77 δ[ppm]	78 δ[ppm]
1	114.0	113.7	113.6
2	145.6 *	145.0 *	145.0 *
3	145.4 *	144.6 *	144.6 *
4	125.5	124.9	124.9
5	132.0	131.4	131.4
6	24.9	24.8	24.8
7	20.3	20.1	20.2
8	44.2	44.1	44.0
9	52.2	52.2	52.2
10	130.6	130.0	130.0
11	218.2 **	216.9	217.2 **
12	52.2	52.2	52.2
13	51.5 *	51.9 *	51.3 *
14	49.9 *	49.8 *	49.1 *
15	46.6	46.4	46.4
16	71.8	71.8	71.5
17	60.0	59.7	59.5
18	20.5	20.6	20.4
19	29.4	29.5	29.4
20	81.3	80.0	80.9
21	25.6	25.3	25.4
22	217.8 **	204.9	217.0 **
23	32.9	121.3	33.0
24	35.9	155.4	38.2
25	83.5	71.4	70.8
26	26.3 *	29.3	29.2
27	26.4 *	29.3	29.2
28	11.6	11.6	11.6
30	20.2	20.1	20.2
$\underline{C}H_3$-COO	173.3	-	-
$\underline{CH}_3$-COO	22.4	-	-
1'	105.6	105.2	105.2
2'	75.2	74.8	74.8
3'	78.1	77.8	77.8
4'	71.3	71.0	71.1
5'	78.5	78.1	78.1
6'	62.4	62.3	62.2

Tabelle 23: ^{1}H-NMR-Resonanzlagen der Nebenglucoside 73, 77 und 78 (CD_3OD; 400 MHz)

H-	73 δ[ppm]	77 δ[ppm]	78 δ[ppm]
1	6.65 (s)	6.68 (s)	6.68 (s)
6_A	2.62-2.90 (m)	2.60-2.65 (m)	2.70-3.05 (m)
6_B	2.62-2.90 (m)	2.80-2.86 (m)	2.70-3.05 (m)
7_A	1.90-2.00 (m)	1.90-2.00 (m)	1.90-2.00 (m)
7_B	2.19-2.29 (m)	2.19-2.29 (m)	2.19-2.29 (m)
8	2.12 (d, J=8,5 Hz)	2.12 (d,J=8,5 Hz)	2.12 (bs)
12_A	2.62 (d,J= 15 Hz)	2.63 (d,J=15 Hz)	2.65 (d,J=15 Hz)
12_B	2.92 (d,J=15 Hz)	2.90 (d,J=15 Hz)	2.70-3.05 (m)
15_A	1.46 (d,J=15 Hz)	1.48 (d,J=15 Hz)	1.48 (d,J= 15 Hz)
15_B	1.90-2.00 (m)	1.90-2.00 (m)	1.90-2.00 (m)
16	4.42 (bt)	4.45 (bt)	4.42 (bt)
17	2.48 (d,J=7Hz)	2.50 (d,J= 7 Hz)	2.50 (d,J=7 Hz)
23_A	2.62-2.90 (m)	6.75 (d,J=16 Hz)	2.70-3.05 (m)
23_B	2.62-2.90 (m)	-	2.70-3.05 (m)
24_A	1.90-2.00 (m)	6.92 (d,J=16 Hz)	1.65-1.75 (m)
24_B	1.90-2.00 (m)	-	1.65-1.75 (m)
1'	4.56 (d,J=7,5 Hz)	4.56 (d,J=7,5 Hz)	4.56 (d,J=7,5 Hz)
2' 3' 4' 5'	3.30-3.50 (m)	3.30-3.50 (m)	3.30-3.50 (m)
6_A'	3.82 (dd,J_1=12,J_2=4 Hz)	3.83 (dd,J_1=12,J_2=4 Hz)	3.85 (dd,J_1=12,J_2= 4 Hz)
6_B'	3.96 (dd,J_1=12,J_2=2,5Hz)	3.96 (dd,J_1=12, J_2=2,5 Hz)	3.97 (dd,J_1=12,J_2=2.5 Hz)
CH_3-			
18	0.97	0.98	0.97
19	1.30	1.30	1.30
21	1.37	1.37	1.37
26	1.42	1.30	1.20
27	1.42	1.30	1.20
28	2.10	2.10	2.10
30	1.00	1.00	1.00
CH_3OO	1.96	-	-

Die Zuordnung der Signale von C-20 bis C-27 (Seitenkette) konnte durch Korrelation mit den entsprechenden C-Atomen von Dihydrocucurbitacin B (74) [146] getroffen werden, dessen Resonanzlagen in guter Übereinstimmung mit denjenigen in 73 liegen.



74

Um zu zeigen, daß auch bei Fevicordin B-glucosid (73)*) die glykosidische Bindung über C-2 vorliegt, wurden von 73 das Hexaacetat 75 und der Monomethylether 76 hergestellt und mit den entsprechenden Derivaten von 20 verglichen.

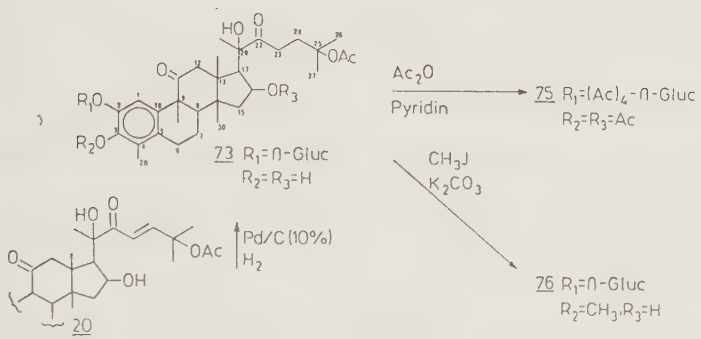


Abb. 23: Fevicordin B-glucosid (73) und chemische Umwandlungen

*) Fevicordin B-2-O-β-D-glucosid wird im Text vereinfacht als Fevicordin B-glucosid bezeichnet.

2.8.2 Fevicordin C-glucosid (77) und Fevicordin D-glucosid (78)

Bei weiterer Chromatographie des Methanol-Rohextraktes (nach Abtrennung des Hauptglucosids 20) an Kieselgel bzw. PVA (siehe experimenteller Teil) fielen die Substanzen 77 und 78 rein an. Sie wurden aus Fraktion D.1.3.2 und BR II/III-1.4 bzw. D-1.4.3 und BR II/III-1.2 kristallin erhalten.

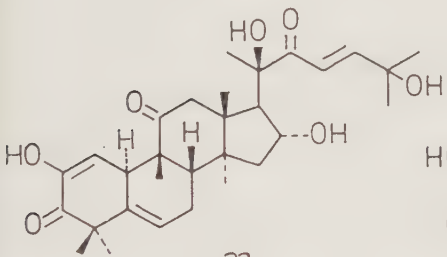
Beide Verbindungen haben sehr ähnliche Polarität, so daß die Trennung nur durch wiederholte Chromatographie der Mischfraktionen möglich ist. Damit konnte auf ähnliche Strukturen geschlossen werden. Das Anfärbeverhalten von 77 mit Anisaldehyd entspricht dem von Fevicordin A-glucosid (20), das von 78 dem von Fevicordin-B-glucosid (73).

Hiermit in Übereinstimmung ist, daß das Elektronenspektrum von 77 demjenigen von 20 gleicht. 77 sollte folglich eine α,β- ungesättigte Carbonylfunktion als Chromophor und ein benzoides System besitzen. 78 dagegen absorbiert im UV bei gleicher Wellenlänge und Intensität wie 73, was eine α,β-ungesättigte Seitenkette ausschloß.

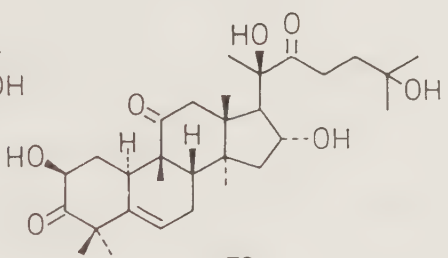
Im DCI-MS(NH_3) von 77 wird als höchste Masse m/z 680 $[662 + NH_4^+]$ registriert. 78 weist das schwerste Ion bei m/z 682 $[664 + NH_4^+]$ auf. Daraus wurde abgeleitet, daß die Verbindungen 77 und 78 an Stelle der Acetoxy-Funktion an C-25 (wie in 20 und 73) eine freie OH-Gruppe tragen.

Bestätigt wurden diese Strukturableitungen durch die ^{1}H-NMR- und ^{13}C-NMR-Spektren (siehe Tabelle 22 und 23, S.111 und S.112).

Im Vergleich zu 20 sind die Methyl-Gruppen C-26 und C-27 im ^{13}C-NMR-Spektrum um 3 ppm tieffeldverschoben, während das nun OH-substituierte C-25 bei etwa 10 ppm höherem Feld in Resonanz tritt. Die Zuordnungen der Seitenketten-C-Atome konnten durch Vergleich mit den ^{13}C-Daten von Cucurbitacin I (22)[78] und R (79)[146] getroffen werden. Die Resonanzlagen der übrigen C-Atome stimmen mit denjenigen in 20 bzw. 73 überein.



22



79

Auch bei Fevicordin C-glucosid (77)*) und Fevicordin D-glucosid (78)*) legten wir die Position der glykosidischen Bindung über die entsprechenden Hexaacetate auf C-2 fest. Aus 77 wurde durch Umsetzung mit Acetanhydrid/Pyridin Fevicordin C-glucosid-hexaacetat (80) und aus 78 Fevicordin D-glucosid-hexaacetat (81) gewonnen (siehe Abb. 24). Durch Hydrierung am Pd/Kohle-Kontakt konnte 78 aus 77 hergestellt werden. Auch die Überführung von 20 in 77 war möglich: Rühren von 20 bei Raumtemperatur in 15%-methanolischer K_2CO_3-Lösung spaltete die Acetatgruppe an C-25 (siehe Abb. 24, S. 116). Ein kleiner Anteil an 77 wurde aus dem Reaktionsansatz durch präparative DC isoliert,

---

*) Fevicordin C-2-O-β-D-glucosid und Fevicordin-D-2-O-β-D-glucosid werden im Text vereinfacht als Fevicordin C-glucosid bzw. als Fevicordin D-glucosid bezeichnet.

spektroskopisch untersucht und mit Fraktion D-1.3.2 verglichen:

die Verbindungen erwiesen sich als identisch.

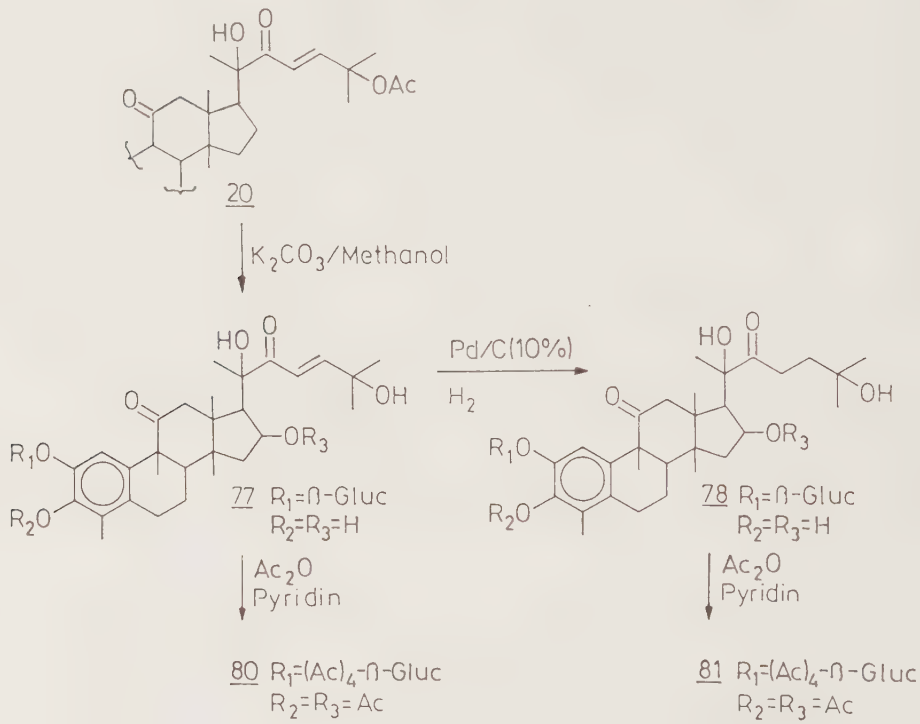


Abb. 24: Fevicordin C-glucosid (77), Fevicordin D-glucosid (78)

und chemische Umwandlungen

2.8.3 Fevicordin E-glucosid (82)

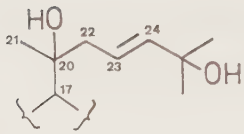
Aus einer weiteren Fraktion (BR-IV-1.3.2.2) erhielt man durch Säulenchromatographie des methanolischen Rohextraktes Substanz 82. Die gleiche Substanz fiel auch bei Tropfengegenstromverteilung (= DCCC) als Fraktion BR-IV-2.4.2 an.

82 weist im Vergleich mit den bisher diskutierten Glucosiden 20, 73, 77 und 78 ein deutlich anderes Ansprühverhalten mit Anisaldehyd-Reagenz auf.

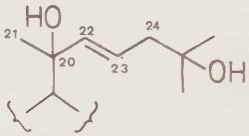
Aus den UV-, MS- und Kernresonanz-Spektren kann die Struktur abgeleitet werden: Das UV-Spektrum weist ein Maximum bei 285 nm auf, was den aromatischen Charakter der Verbindung anzeigt, wie auch ein Maximum bei 224 nm, letzteres jedoch mit signifikant geringerer Intensität als bei 20, so daß eine α, β-ungesättigte Carbonylfunktion nicht vorliegen konnte.

Die Aufnahme des ^{13}C-NMR-Spektrums zeigt 8 sp^2-hybridisierte C-Atome an, von denen 6 in Übereinstimmung mit 20 dem aromatischen Ring A zugeordnet werden können (Tab. 24, S. 122). Auch die übrigen Resonanzsignale im Bereich des tetracyclischen Grundgerüstes von 20 sind voll korrelierbar. Die zwei weiteren "ungesättigten" C-Atome waren daher im Bereich der Seitenkette (an C-17) zu suchen. Die verbleibenden ^{13}C-Signale wiesen auf das Strukturelement 83 hin, eine Acetat-Gruppe konnte ausgeschlossen werden. In Übereinstimmung mit Teilstruktur 83 ist, daß im Vergleich zu den ^{13}C-NMR-Spektren von 20 nur eine Carbonylfunktion bei 217.4 ppm in Resonanz tritt (C-11), und ein "neues" Signal bei 47.2 ppm, das wir C-22 zuordnen wollen.

Für die Seitenkette (an C-17) kam jedoch 84 als zweite Strukturalternative in Frage, die durch weitere spektroskopische Untersuchungen ausgeschlossen werden mußte.



83

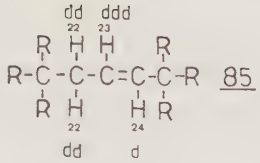


84

Die verbliebenen ^{13}C-Signale wiesen auf einen β-glykosidisch gebundenen Glucoserest hin.

Strukturelement 83 bzw. 84 wurde durch das ^{1}H-NMR-Spektrum von 82 (Abb. 25), weiter abgesichert:

Eines der beiden olefinischen Protonen erscheint als Dublett (δ = 5.62 ppm, J = 16 Hz), das andere als dreifaches Dublett (δ = 5.70 ppm, J_1 = 16 Hz, $J_2 = J_3$ = 7 Hz). Die zugehörigen Kopplungspartner erkennt man bei 2.38 ppm (J_1 = 14, J_2 = 7 Hz) und bei 2.28 ppm (J_1 = 14, J_2 = 7 Hz). Letzteres ist vom Multiplett des H-7_B überlagert (Strukturelement 85).



85

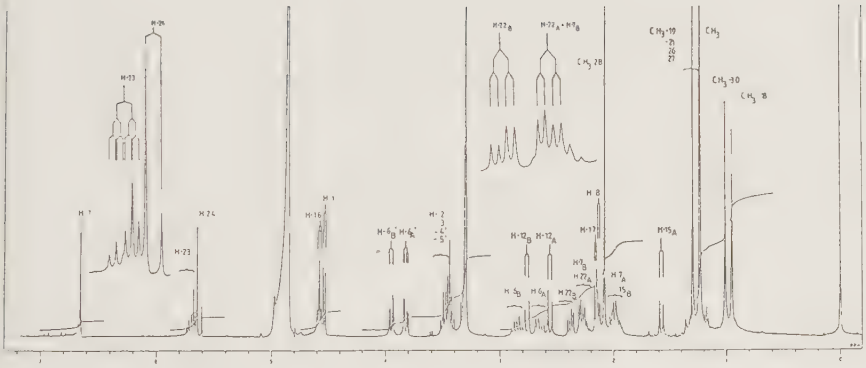


Abb. 25: ^{1}H-NMR von 82 (in CD_3OD)

Eine Entscheidung zwischen den Strukturalternativen 83 und 84 war anhand des Massenspektrums von 82 möglich. Die Fragmentierung des Molekülions sollte bevorzugt in allylischer Stellung erfolgen [147]. Für 83 war folglich eine Abspaltung von $C_6H_{11}O$, bzw. für 84 eine Abspaltung von C_3H_7O zu erwarten.

Im DCI-MS (NH_3) von 82 erscheint das Anlagerungsion $[M+NH_4^+]$ bei m/z 666. Schlüsselfragmente stellen die Massen 648 und vor allem

m/z 566 dar, das aus m/z 666 durch Abspaltung der oben geforderten $C_6H_{11}O$, allerdings unter Übertragung eines Protons hervorgegangen sein sollte. Ein Ion bei m/z 607 (entsprechend m/z 666 - C_3H_7O) wird nicht beobachtet (s. Abb. 26), so daß 84 als Strukturalternative für die Seitenkette (an C-17) für 82 ausgeschlossen werden konnte.

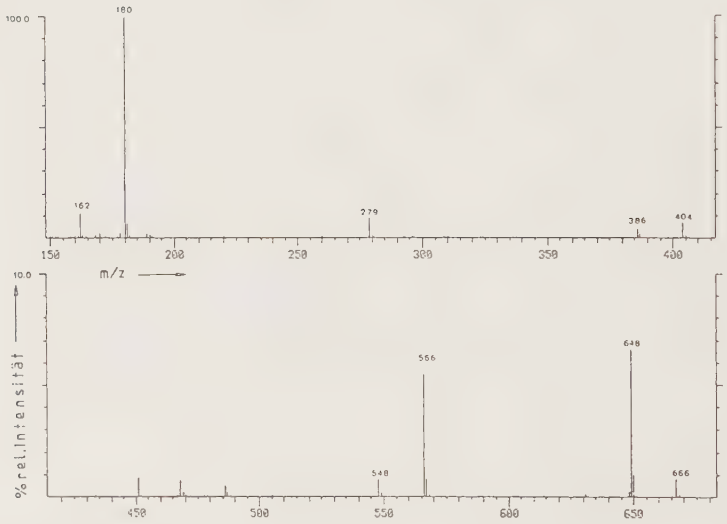
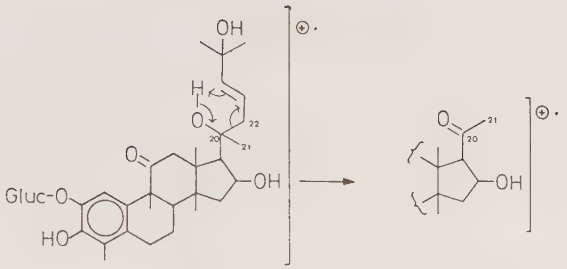


Abb. 26: DCI-MS (NH_3) von 82

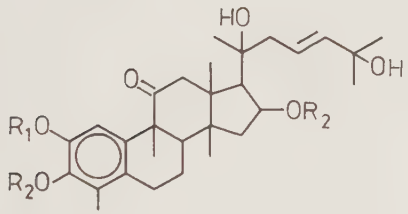
In Analogie zum Zerfallsweg bei Cucurbitacin D (5), den Audier und Das [76] beschreiben (s. Abb. 3, S. 28) schlagen wir folgenden Mechanismus zur Abspaltung der Seitenkette als $C_6H_{12}O$ aus 82 unter Übertragung eines Protons vor:

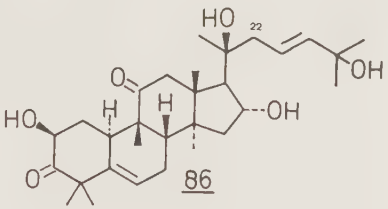


m/z 666 m/z 566

Abb. 27: Entstehen von m/z 566 im DCI-MS (NH_3) von 82

82 entspricht in der Seitenkette dem 22-Desoxocucurbitacin D (86) aus Lagenaria siceraria [148].





86

82 R_1=β-Gluc, R_2=H

87 R_1=(Ac)$_4$-β-Gluc, R_2=Ac

Spektroskopische Daten für 86 sind in der Literatur leider nur unpräzise und unvollständig angegeben [148]. Die Resonanzlagen der Protonen an C-23 und C-24 werden als nicht aufgelöstes Multiplett zwischen 5.3 und 6 ppm beschrieben, was insofern mit den Beobachtungen an 82 übereinstimmt.

Die Festlegung der glucosidischen Bindung auf C-2 oder C-3 erfolgte wiederum durch Vergleich der ^{13}C-NMR-Spektren von 82 und seinem Acetylierungsprodukt, dem Hexaacetat 87. Die charakteristische Verschiebung

Tabelle 24: ^{13}C-NMR-Resonanzlagen von 82 und 87 (22.5 MHz)

C-Atom	82 / CD_3OD δ [ppm]	87 / $CDCl_3$ δ [ppm]
1	113.5	110.0
2	144.6 *	146.3
3	144.9 *	137.1
4	124.8	130.3
5	131.5	129.2
6	24.9	24.1
7	20.3	20.3
8	44.2	42.2
9	52.1 *	50.7 *
10	130.1	135.6
11	217.4	213.9
12	52.0 *	51.4 *
13	51.1	48.4
14	49.7 *	49.5 *
15	46.7	43.8
16	71.2	75.3
17	60.5	56.7
18	20.3	20.5 - 21.4
19	29.2	29.8
20	75.6 **	75.4 **
21	26.5	26.3
22	47.2	46.3
23	123.8	121.3
24	142.8	143.6
25	73.1 **	73.8 **
26	29.9	30.0
27	29.9	30.0
28	11.5	12.1
30	19.9	20.5 - 21.4
$\underline{C}H_3$-CO	-	20.5 - 21.4 (6 x)
CH_3-$\underline{C}$OO	-	168.6 - 170.8 (6 x)
C-1'	105.2	98.6
C-2'	74.8	70.6
C-3'	77.8	72.9
C-4'	71.1	68.2
C-5'	78.2	72.3
C-6'	62.2	61.8

*) **) Zuordnungen gegebenenfalls umgekehrt

des Signals von C-1 (s. Abschnitt 2.7.3, S. 104) ließ auch in diesem Glucosid eine eindeutige Aussage zu (Tab. 24), so daß in 82 ein 2-O-β-Glucosid vorliegt. Wir bezeichnen diese Nebenverbindung daher als Fevicordin E-glucosid* (82).

2.8.4 Fevicordin A und B (43) und (88)

Aus Fraktion A-4.1.2.4 fiel eine oxidationsempfindliche Verbindung an, deren DC-Eigenschaften und Ansprühverhalten (mit Anisaldehyd-Reagenz) identisch waren mit denjenigen von Fevicordin A (43). Aus Fraktion A-4.2.2.1 wurde die ebenfalls oxidationsempfindliche Verbindung 88 isoliert, deren Polarität ähnlich derjenigen von 43 war, was ebenfalls für ein genuines Aglykon sprach.

In Anbetracht der Oxidationsempfindlichkeit dieser Verbindungen sollten diese unter noch schonenderen Bedingungen isoliert werden: Daher wurde bei der Extraktion einer zweiten Lieferung von Samen vor dem Methanol-Auszug ein CH_2Cl_2-Extrakt angefertigt, der unter weitestgehenden Vorsichtsmaßnahmen (Licht-, Sauerstoffausschluß) behandelt wurde, wie bei der Isolierung von 43 beschrieben (s. Abschnitt 2.7.1.1., S. 66**). Bei der Aufarbeitung fielen dann erwartungsgemäß größere Mengen der beiden genuinen Aglyka 43 und 88 aus den Fraktionen C-1.3 und C-1.2.3 bzw. C-1.2.1 an (s. Exp. Teil).

Die Spektren bestätigten die Identität von 43 mit dem durch enzymatische Spaltung bereits früher gewonnenen Aglucon von Fevicordin A-glucosid (20).

---

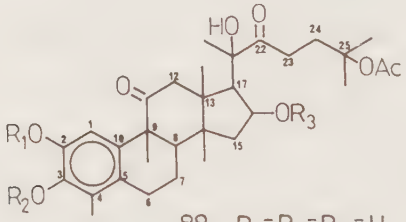
*) Fevicordin E-2-O-β-D-glucosid wird vereinfacht im Text als Fevicordin E-glucosid bezeichnet.

**) Auf die Stabilisierungsmöglichkeit der zuckerfreien Verbindung 43 durch Zusatz einer äquimolaren Menge Ascorbinsäure als Antioxidans

UV- und IR-Spektren schließen für 88 das Strukturelement einer α, β-ungesättigten Carbonylgruppierung aus.

Aus den NMR- und MS-Daten läßt sich eindeutig die angegebene Struktur von 23,24-Dihydro-fevicordin A (88) ableiten. Es handelt sich also um das Aglykon von Fevicordin B-glucosid (73), was durch enzymatische Spaltung von 73 mit Cellulase bestätigt wurde.

In Analogie zu den Derivatisierungen an 43 wurde 88 zum Triacetat 89 acetyliert, zum Dimethylether 90 methyliert und eine Methylendioxy-Gruppe eingeführt zum Fevicordin B-formaldehydacetal (91).



88 $R_1=R_2=R_3=H$

89 $R_1=R_2=R_3=Ac$

90 $R_1=R_2=CH_3, R_3=H$

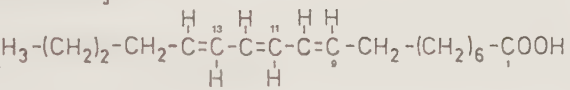
91 $R_1/R_2=(-CH_2-), R_3=H$

2.9 Charakteristische Fettsäuren aus den Samen von Fevillea cordifolia

Der Anteil der in Petrolether löslichen Bestandteile der Fevillea cordifolia - Samen betrug etwa 60 %. Bei der Extraktion mit Petrolether konnte die Droge beinahe gänzlich vom Samenfett befreit werden. Die Untersuchung des Petrolether-Extraktes diente der Bestimmung der Fettkennzahlen und der Charakterisierung der Fettsäurezusammensetzung der Triglyceride (Exp. Teil).

Der unverseifbare Anteil des Fettextraktes betrug 0.8 % und wurde nicht weiter untersucht.

Die Analyse der Fettsäuremethylester - erhalten durch Umesterung mit methanolischer Natriummethylatlösung [49] - mittels Gaschromatographie ergab, daß das Samenöl zu über 50 % Stearinsäure enthält [149]. Weiteres herausragendes Merkmal des Fevillea cordifolia - Fettes ist der hohe Anteil von ca. 30 % an α - Eleostearinsäure (92) [= (Z,E,E)Octadeca-9,11,13-triensäure] [149].



92

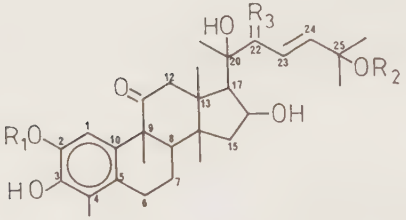
Dieser Befund steht in voller Übereinstimmung mit der Untersuchung von Castro und Mora [62], die über das Vorkommen von 92 in Fevillea cordifolia berichten.

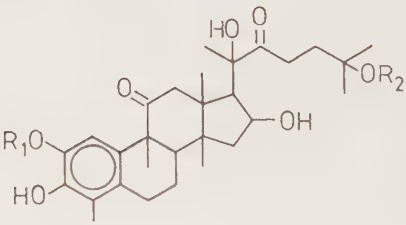
α-Eleostearinsäure wurde auch in einer anderen Fevillea-Art gefunden: Tulloch und Bergter untersuchten Fevillea trilobata und ermittelten einen Anteil von insgesamt 39 % Octadeca-9,11,13-triensäuren [30 % (Z,E,Z) und 9 % (Z,E,E)] [63].

Aufgrund des hohen Anteils an dreifach ungesättigten Fettsäuren läßt sich das Fett der Samen von Fevillea cordifolia dem 2. Öltyp der Cucurbitaceen-Samenöle zuordnen, dem sogenannten "Leinöltyp" (siehe Abschnitt 1.2, S. 9).

2.10 Ergebnisse und Diskussion

Aus den Samen von Fevillea cordifolia wurden 7 bisher noch nicht beschriebene Verbindungen, die Fevicordin-glucoside A (20), B (73), C (77), D (78), E (82) und die genuinen Aglyka Fevicordin A (43) und B (88) isoliert.





20 R_1=β-Gluc, R_2=Ac, R_3=O
43 R_1=H, R_2=Ac, R_3=O
77 R_1=β-Gluc, R_2=H, R_3=O
82 R_1=β-Gluc, R_2=H, R_3=H_2

73 R_1=β-Gluc, R_2=Ac
78 R_1=β-Gluc, R_2=H
88 R_1=H, R_2=Ac

Im Zusammenhang mit der Strukturaufklärung wurden an 20 und 43 verschiedene Strukturmodifikationen und Abbau-Reaktionen vorgenommen. Einen Überblick dazu gibt Abb. 28, (S. 127).

Für die Strukturermittlung waren spektroskopische Untersuchungen von wesentlicher Bedeutung und hierbei insbesondere die ^{13}C-NMR-Studien.

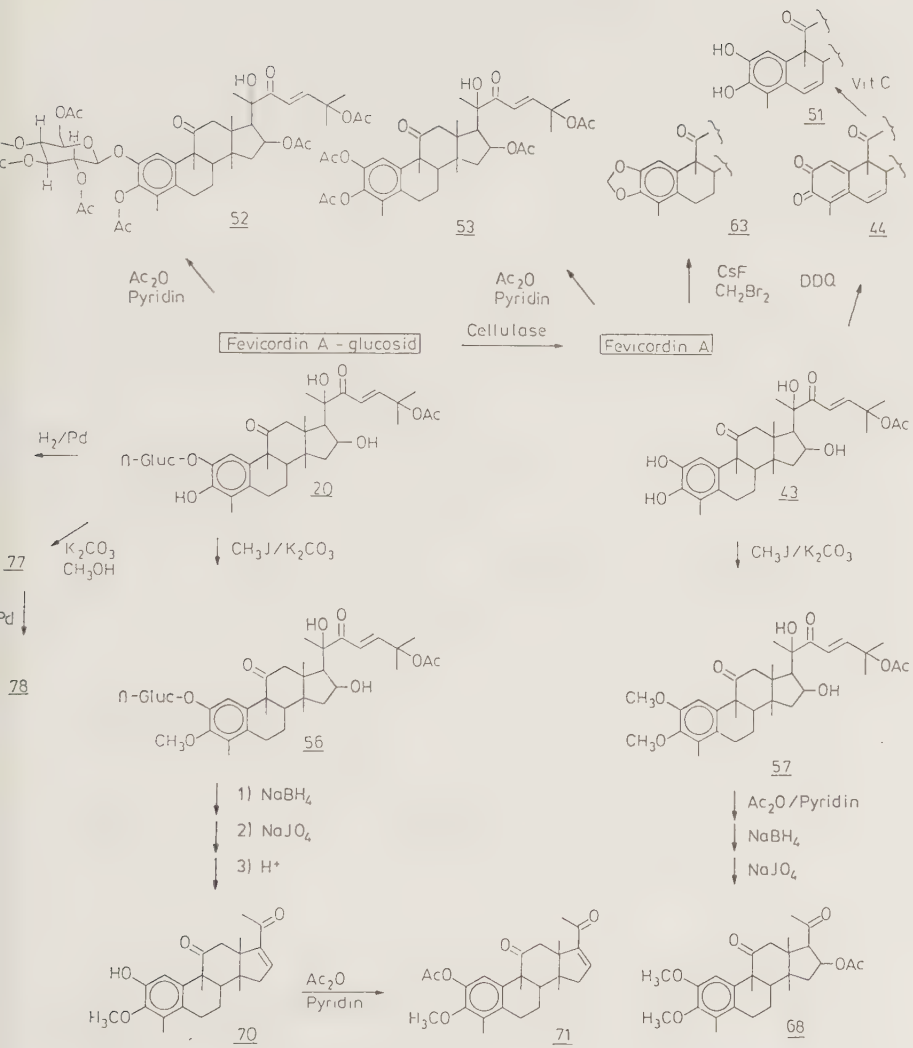


Abb. 28: Übersicht über die wichtigsten Derivate von 20 und 43

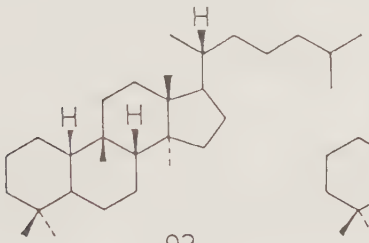
Die Erkennung und Zuordnung aller Strukturelemente erforderte den Einsatz von 2 D-NMR-Methoden: Heteronukleare Korrelationsspektren ermöglichten hierbei die Verknüpfung der einzelnen Strukturelemente über die diversen quartären Kohlenstoff-Atome hinweg und gestatteten die zweifelsfreie Festlegung der Konstitution des Fevicordin-Grundgerüstes.

Bei den Fevicordinen handelt es sich um eine neue Verbindungsklasse, die bezüglich des Kohlenstoff-Grundgerüstes den Cucurbitacinen - charakteristische Inhaltsstoffe der Gurkengewächse [4] - stark ähnelt. Wie diese weisen sie ein tetracyclisches Ringsystem auf mit CH_3-Gruppen an C-9 (statt an C-10), C-13 und C-14, einer Carbonylfunktion an C-11 und einer Hydroxy-Gruppe an C-16. Analog den meisten Cucurbitacinen besitzen die Fevicordine an C-2 und C-3 Sauerstoff-Funktionen. Der Unterschied zu den Cucurbitacinen besteht darin, daß der Ring A aromatisch ist und C-4 statt zwei nur eine CH_3-Funktion trägt. Strukturmodifikationen innerhalb der Fevicordin-Klasse treten in voller Analogie zu den Cucurbitacinen vor allem in der C-8-Seitenkette (an C-17) auf. So trägt 20 anstelle der OH-Gruppe an C-25 wie bei 77, eine Acetoxy-Gruppe, bei 73 und 78 ist die Bindung zwischen C-23 und C-24 gesättigt, im Gegensatz zu 20, 77 und 82.

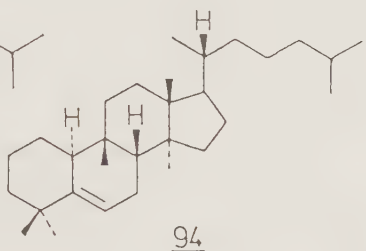
Zur Nomenklatur:

Für das Kohlenstoff-Gerüst der Cucurbitacine 93 wurde der Name "Cucurbitan" bzw. in Anlehnung an die "IUPAC-IUP 1967 Revised Tentative Rules for Steroid Nomenclature" der Name 5 α-Cucurbitan oder 19(10→9β)-abeo-5 α-Lanostan vorgeschlagen [74].

Alle natürlich vorkommenden Cucurbitacine leiten sich von 94 ab und tragen ein α-orientiertes Proton und eine Doppelbindung zwischen den C-Atomen 5 und 6. 94 ist als 10 α-cucurbit-5-ene oder 19(10→9β)-abeo-10 α-Lanost-5-ene zu bezeichnen [74].

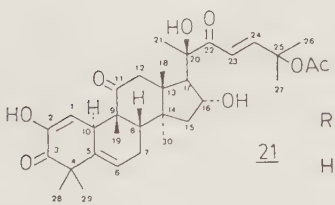


93

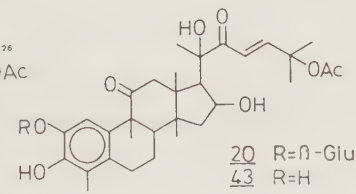


94

In Chemical Abstracts (Index Guide 85) lautet die Nomenklatur für Cucurbitacin E (21) folgendermaßen:
(9 β,10 α,16 α,23 E)-25-Acetyloxy-2,16,20-trihydroxy-9-methyl-19-norlanosta-1,5,23-trien-3,11,20-trion.



21



20 R=ß-Glucosyl
43 R=H

Da Fevicordine nur eine CH_3-Gruppe an C-4 aufweisen, folglich ein C-Atom weniger besitzen als Cucurbitacine, sonst aber große Struktur-

ähnlichkeit mit diesen Verbindungen haben, wollen wir die neue Substanzklasse als "29-Norcucurbitane" bezeichnen.

In Anlehnung an oben genannte Nomenklatur ist Fevicordin A (43) als beispielhafter Vertreter wie folgt zu benennen:

(23 E)-25-Acetyloxy-2,3,16,20-tetrahydroxy-9-methyl-9,29-bisnorlanosta-1,3,5(10),23-tetraen-11,22-dion.

Zur Stereochemie:

Zur Konfiguration an den sterischen Zentren der Fevicordine, wie z.B. C-8 und C-9, die bei Cucurbitacinen cis-ständig zueinander angeordnet sind (jeweils β-konfiguriert) [26,28,150,151] kann folgendes gesagt werden: Versuche durch NOE-Experimente (NOE = Nuclear-Overhauser-Effekt) die relative Konfiguration abzuklären blieben ohne Erfolg, wegen der starken Überlagerung der Signallagen von interessierenden CH_3-Gruppen und Protonen mit anderen Resonanzen.

Die Signallage von C-8 in den ^{13}C-NMR-Spektren des Fevicordin A-glucosid (20) stimmt gut mit Literaturwerten für Cucurbitacine überein. C-9 tritt bei 20 um +2.8 ppm tieffeldverschoben in Resonanz im Vergleich zu den entsprechenden Cucurbitacin-Werten, was durch die benzylische Position von C-9 in 20 erklärt werden kann (s. Tab. 4, S. 38).

Die im COSY-Experiment von 20 festgestellten kleinen Kopplungskonstanten der H-8/H-7_A- und H-7_A/H-6_A-Kopplung sprechen für Diederwinkel von etwa 90° zwischen diesen Protonen (s.S. 54). Eine derartige Anordnung im Modell von Fevicordin A macht eine cis-Verknüpfung der Ringe B und C möglich.

Auch die Resonanzlagen der Protonen 8, H-7_A und H-7_B stimmen mit denen

in Cucurbitacinen überein.

Diese NMR-spektroskopischen Befunde stützen die Arbeitshypothese einer cis-Anordnung zwischen den Ringen B und C bei den Fevicordinen, analog den Cucurbitacinen.

Eine gleiche sterische Anordnung im Bereich der Ringe C,D und der Seitenkette an C-17 wird ebenfalls durch die Ähnlichkeit der Fevicordine mit den Cucurbitacinen in den spektroskopischen Eigenschaften, vor allem in der ^{13}C-NMR-Spektroskopie, nahe gelegt.

Dies zeigt sich sowohl bei NMR-Experimenten mit den unveränderten Glucosiden, als auch mit den chemisch modifizierten Derivaten, vor allem aber bei den seitenkettenverkürzten Verbindungen (s. Abschnitt 2.7.3.1, S. 108).

Wie dies auch bei den Cucurbitacinen der Fall ist [28,152], würde das bedeuten, daß die CH_3-Gruppen an C-13 und C-14 transständig angeordnet sind, die C-16-OH-Funktion α-konfiguriert ist und die Seitenkette an C-17 β-ständig vorliegt.

Zu den chemischen Eigenschaften:

Durch das Brenzcatechin-Strukturelement des Ringes A sind die zuckerfreien Fevicordine wesentlich instabiler als Cucurbitacine. Der hohen Oxidationsempfindlichkeit muß durch bestimmte Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit diesen Verbindungen Rechnung getragen werden. Im Rahmen dieser Arbeit (Abschnitt 2.7.1.1, S. 66) wurde auf die erforderlichen Bedingungen wie Sauerstoff- und Lichtausschluß, sowie Stabilisierungsmöglichkeiten mit Ascorbinsäure (s. S. 80) ausführlicher eingegangen.

Die glykosidisch gebundenen Fevicordine sind gegenüber Luftsauerstoff

erheblich weniger empfindlich und können ohne Inertgas (N_2) gehandhabt werden. Die Instabilität gegenüber Mineralsäuren (s. S.66 und S. 104) und Basen wie NaOH (s. S. 96) ist auch bei Cucurbitacinen beschrieben [96,133-136].

Die Fevicordine A bis E liegen als 2-O-β-D-glucoside vor; im Fall von Verbindung 43 und 88 konnten die genuinen Aglyka Fevicordin A und B isoliert werden.

Die Möglichkeit der artifiziellen Entstehung von 43 und 88 im Zuge der Aufarbeitung des Rohextraktes kann ausgeschlossen werden, da beide Verbindungen dünnschichtchromatographisch im Rohextrakt nachgewiesen wurden. Entsprechendes gilt für die isolierten Verbindungen 73, 77, 78 und 82.

2.11 Biogenetische und chemotaxonomische Aspekte

Sekundäre pflanzliche Stoffwechselprodukte können nach biogenetischen Gesichtspunkten in fünf Hauptgruppen eingeteilt werden [153]:

1. Polyketide (aus Acetat-Bausteinen; z.B. Anthrachinone)
2. Shikimisäureabkömmlinge (aus C_6-C_3-Bausteinen; z.B. Kaffeesäure)
3. Terpenoide (aus Isopren-Bausteinen über die Mevalonsäure)
4. Kohlehydrate (aus Zuckerbausteinen)
5. Aminosäurederivate (z.B. Alkaloide)

In vielen Fällen ist eine strenge Einteilung in eine der oben genannten Gruppen nicht möglich, weil mehrere Biogenesewege bei der Biosynthese eines Naturstoffes einmünden. Cucurbitacin-Glykoside entstammen

z.B. dem Kohlehydrat- und dem Terpenoid-Stoffwechsel.

Abb. 29 zeigt den Aufbau der Grundkörper der Terpene, der über Mevalonsäure (95) [154], Δ^3-Isopentenyl-pyrophosphat (96 a) und γ,γ-Dimethylallyl-pyrophosphat (96 b) zu Geranylpyrophosphat (97), Farnesylpyrophosphat (98) und Squalen (99) verläuft. 99 stellt die zentrale Ausgangsverbindung für die Biosynthese der Triterpene dar [155].

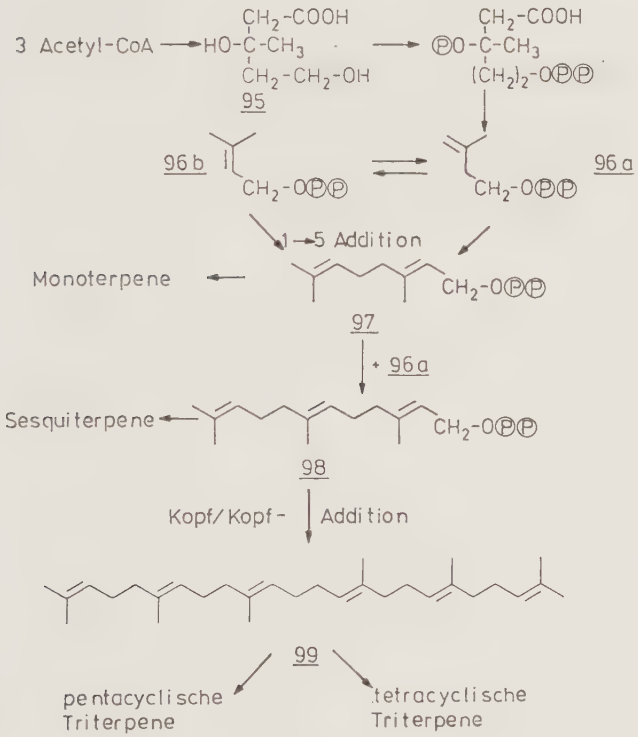


Abb. 29: Aufbau von Squalen (99)

Direkte Vorstufe für den weiteren Biosyntheseweg ist jedoch nicht 99, sondern 2,3-Oxido-squalen (100) [156].

Die Bildung der pentacyclischen Triterpene erfolgt ohne größere Gerüstumlagerungen durch Cyclisierung von 100 [157], während die tetracyclischen Triterpene über einen Biosyntheseweg gebildet werden, bei dem mehrere Methylgruppen oxidativ abgespalten bzw. verschoben werden [158].

Die Einleitung der Cyclisierung erfolgt durch Angriff eines Protons am Epoxidsauerstoff und der damit verbundenen Bildung eines Carbeniumions. Dieser Biogeneseschritt erklärt, warum fast alle Naturstoffe dieser Substanzklasse eine Sauerstoffunktion an C-3 besitzen, wie das auch bei den Cucurbitacinen der Fall ist.

Abb. 30 stellt die verschiedenen denkbaren Reaktionswege dar, um von 100 zum Cucurbitacin-Grundgerüst zu gelangen [159].

Durch Cyclisierung von 100 entsteht primär das Kation 101, das anschließend durch H- bzw. CH_3-Transfers in das Lanostan-C-9-Carboniumion 102 umgewandelt wird [160]. Von 102 aus ergeben sich verschiedene denkbare Biosynthesewege zum Cucurbitacin-Gerüst (Abb. 30). Verlust eines Protons an C-11 (Weg a) würde zum Parkeol (103) führen, einem tetracyclischen Triterpen, das z.B. in der Pflanze Butyrospermum parkii [161] (Sapotaceae) gefunden wurde. Durch Wanderung der Methylgruppe an C-10 nach C-9 mit nachgeordneter Protonenwanderung von C-5 nach C-10 und der Eliminierung von H-6 entsteht das Cucurbitacin-Gerüst 104.

Eine Alternative dazu stellt Weg b dar: Der Verlust eines Protons

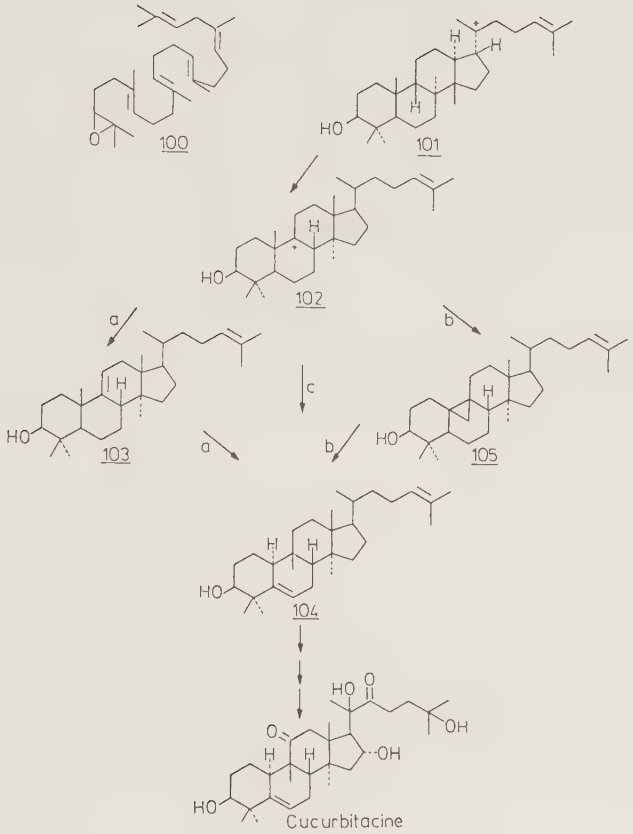


Abb. 30: Biosynthesewege zum Cucurbitacin-Grundgerüst nach Lit.[159)]

der C-19-Methylgruppe kann bei 102 zu einem Ringschluß zwischen C-9 und C-19 führen, so daß Cycloartenol (105) entsteht. 105 wurde z.B. aus Tillandsia usneoides, einem Epiphyten aus der Familie der Bromeliaceae

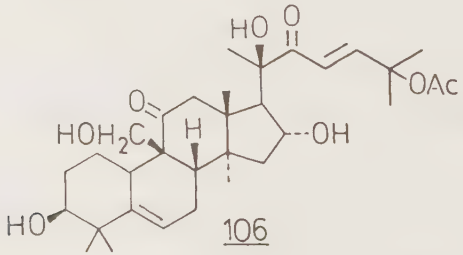
isoliert [162]. Durch Öffnung des Cyclopropanringes unter Bildung einer Methyl-Gruppe an C-9 mit anschließendem H-Transfer und Protonen-eliminierung aus C-6 bildet sich 104.

Bei der dritten Möglichkeit (Weg c) könnte Cucurbitadienol 104 auch durch mehrfache Wanderungen direkt aus 102 hervorgehen (Me-10 → Me-9, H-5 → H-10), wiederum unter Eliminierung des Protons an C-6.

Die Forschungsgruppe um Balliano und Caputo schlägt Weg c (Abb. 30) und die Bildung von 104 aus 102 mit Hilfe einer speziellen Synthetase vor [159]. Begründet wird dies durch Versuche mit verschiedenen radioaktiv markierten Precursoren, die Cucumis sativus-Sämlingen in der Nährstofflösung angeboten wurden. Bot man [2-^{3}H]-Cycloartenol (= [2-^{3}H] -105) an, entstanden 4-Desmethyl-Sterine, 4-α-Methylsterine und Cycloartenol-Ester.

Bei Zugabe von [2-^{3}H] -Parkeol (= [2-^{3}H] -103) wurde ein kleiner Teil in Parkeol-Ester umgewandelt, der Rest blieb unverändert und wurde von der Pflanze nicht weiter umgebaut.

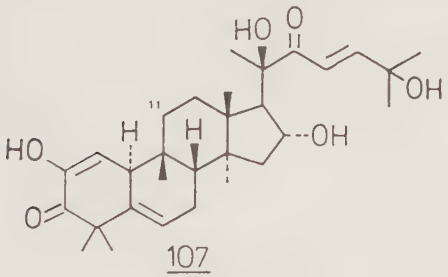
Bei Incorporierung von [2-^{3}H] -10 α-Cucurbita-5,24-dien-3β-ol (= [2-^{3}H] - 104) jedoch, wurden 70 % der Radioaktivität in einem nach der Keimung erfolgten Isolierungsverfahren in Cucurbitacin C (106) wiedergefunden [159].



106

104 wurde aus den Samenölen verschiedener Cucurbitaceen isoliert, z.B. aus Lagenaria - Arten, Trichosanthes kirilowii, Cucurbita pepo und Bryonia dioica - Keimlingen [163,164], so daß 104 als direkter Vorläufer der Cucurbitacine angesehen werden kann.

Offensichtlich fungieren entsprechende 11-Desoxo-Verbindungen als Vorstufen der Cucurbitacine. So wurde als Zwischenstufe auf dem Biosyntheseweg zu Cucurbitacin I (22), das 11-Desoxocucurbitacin I (107) aus Desfontainia spinosa [165] (Desfontainiaceae) isoliert.



107

Man kann einen hypothetischen Biosyntheseweg der Fevicordine aus Cucurbitacinen mit 1,2-Dehydro-2-hydroxy-3-keto-Anordnung im Ring A formulieren, indem die Aromatisierung des Ringes A durch Verlust einer der beiden geminalen CH_3-Gruppen an C-4 eingeleitet wird (Abb. 31).

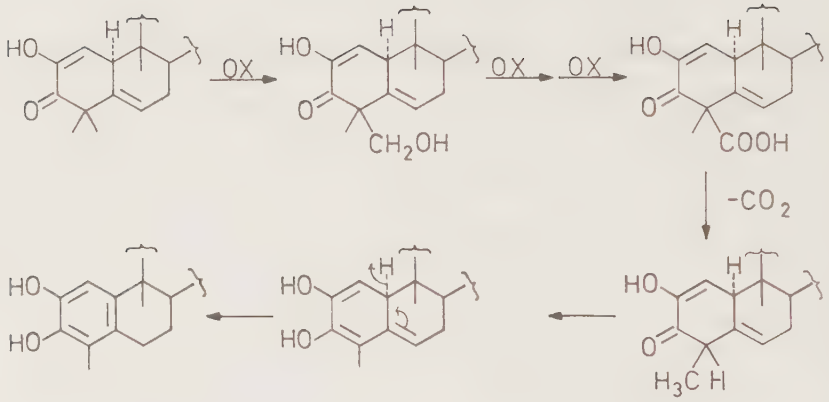


Abb. 31: Hypothetischer Biosyntheseweg zum Fevicordin-Grundgerüst

Das Vorkommen von Cucurbitacinen ist nicht auf Pflanzen der Familie der Cucurbitaceen beschränkt.

Sie wurden z.B. auch in Cruciferae, Elaeocarpaceae, Scrofulariaceae, Primulaceae und Rosaceae nachgewiesen [73,74,85,166,167].

Aus dem Vorkommen von Cucurbitacinen in einer Pflanze kann also nicht auf die Zugehörigkeit zu den Cucurbitaceen geschlossen werden. Andererseits ist das Vorkommen von Cucurbitacinen in den Gurkengewächsen weit verbreitet [4].

Vereinzelte phytochemische Untersuchungen an Fevillea cordifolia beschäftigten sich bisher nur mit der Analyse der Fett-Fraktion [62]. Insbesondere sind keinerlei Angaben über Strukturen der polaren Inhaltsstoffe, wie z.B. Cucurbitacine oder ähnliches, bekannt. Wir konnten jedoch nachweisen, daß außer den Fevicordinen auch tetracyclische Triterpen-Glykoside nicht aromatischer Natur vorkommen.
Ob Verbindungen vom Fevicordin-Typ auch in anderen Fevillea-Arten vorkommen und gegebenenfalls ein chemotaxonomisches Merkmal dieser Gattung darstellen, muß noch Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben.

2.12 Pharmakologische Aspekte

Die Cucurbitacine weisen verschiedene pharmakologische und biologische Wirkungen auf: Sie besitzen z.B. purgative Eigenschaften, was die Zaunrübenwurzel zu einem früher häufig verwendeten Drastikum machte [52]. Wichtigster pharmakologischer Aspekt ist ein carcinostatischer Effekt, der an Mäusen bei verschiedenen transplantierten Tumoren nachgewiesen wurde [8,152,168,169]. Konopa und Mitarbeiter haben eine ausführliche Studie über verschiedene Cucurbitacine und deren cytotoxische Aktivität publiziert [169].
Cucurbitacin D (5), E (21) und I (22) (s. S. 4 und S. 24) stellten sich als die wirksamsten "Cystostatika" der Cucurbitacin-Reihe heraus mit ED_{50}(=Effektive Dosis)-Werten von etwa 0.01 - 0.05 µg/ml im Gewebe-

kulturtest (z.B. Helene Langer-Zervix-Carcinom-Zellen). Als weniger wirksam erwiesen sich 5, 21 und 22 beim in vivo-Test mit transplantierten Tumoren bei der Maus. Hier wurden ED_{50}-Dosen eingesetzt von etwa 0.4 mg/kg/Tag (Intraperitoneale Applikation). Diese Dosierung liegt jedoch nahe der toxischen Grenze (mittlere tolerable Dosis bei 5 z.B. 0.4 - 0.8 mg/kg), so daß ein therapeutischer Einsatz bisher nicht möglich scheint [169].

Die Toxizität von Cucurbitacinen korreliert offensichtlich mit ihrer cytostatischen Aktivität, so daß es auch Cucurbitacine mit entsprechend geringerer Toxizität gibt, z.B. Cucurbitacin L (108), das 23,24-Dihydrocucurbitacin I. Konopa vermutet, daß die cytostatische und toxische Wirkung an die Anwesenheit der 23,24-Doppelbindung in der Seitenkette gebunden ist.

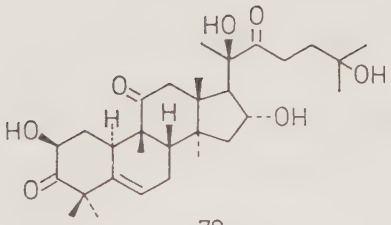
Die Publikation einer anderen Forschungsgruppe nennt für Cucurbitacin D (5) einen vergleichbaren ED_{50}-Wert von etwa 1 mg/kg bei intravenöser Applikation an verschiedenen Versuchstieren. Der Tod trat durch Kreislaufkollaps und Atemlähmung ein [170].

Rehm beschreibt die Vergiftungserscheinungen mit bitten schmeckenden Gurkengewächsen als "strychninartig" [171].

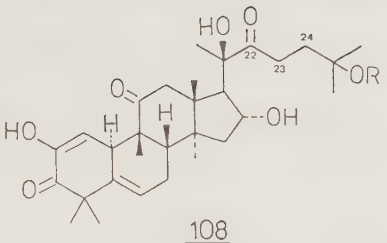
Die Einnahme von Überdosen an Koloquinten kann zu Erbrechen, heftigen Schmerzen im Epigastrum, Sehstörungen, Delirium und Schwindel führen [172].

Im Rahmen einer Toxizitätsstudie mit Cucurbitacin R (79) wurde an der Maus eine antifertile Aktivität bei peroraler Applikation nachgewiesen, die auf einer Ovulationshemmung beruhte.

Die Kontrazeption trat allerdings erst bei sehr hohen Dosen (100 mg/kg) auf [173].

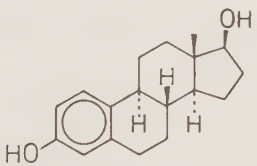


79



108

Obwohl die Struktur der Fevicordine an östrogene Hormone, z.B. das Östradiol (109) erinnert, konnte die kontrazeptive Wirkung aufgrund der ethnologischen Berichte, die Fevillea cordifolia - Samen besitzen sollten [55], bis jetzt nicht belegt werden.



109

Es ist jedoch hinzuzufügen, daß die Untersuchungen noch nicht abgeschlossen sind und insbesondere Tests mit reinem Fevicordin A-glucosid (20) bzw. Fevicordin A (43) noch nicht vorliegen.

Im Tierversuch an der Ratte zeigte eine Suspension der geschälten, zerkleinerten Fevillea cordifolia - Samen (Endosperm) bei oraler Applikation allerdings weder einen ovulationshemmenden noch einen abortiven Effekt [174].

Die Dosierung wurde auf die Humandosis bezogen ("Größe einer Mandel" [55],

entsprechend etwa 2 g Endosperm der Samen), so daß ca. 40 mg Endosperm/kg Ratte zur Anwendung kamen.

Der Gehalt an Fevicordin A-glucosid (20) beträgt im Endosperm der Samen ca. 2 %; folglich wurden etwa 0.8 - 1 mg 20 pro kg Ratte verabreicht, eine Menge, die uns zu gering erscheint, um eine antifertile Aktivität der F. cordifolia - Samen bereits endgültig ausschließen zu können.

Bei einem pharmakologischen Screening von 20 wurde gefunden, daß Fevicordin A-glucosid eine sehr gute anti-inflammatorische Wirkung beim Carrageenan-induzierten-Rattenpfoten-Ödem zeigt.

Auch das Aglykon 43 erwies sich als stark entzündungshemmend.

Im Zuge weiterer Untersuchungen wurden außerdem auch die Nebenglucoside 73, 77 und 78, die in ausreichenden Mengen zur Verfügung gestellt werden konnten, und die nachfolgend aufgeführten Derivate von 20 und 43 in die pharmakologischen Studien mit einbezogen: Fevicordin A-glucosid-hexaacetat (52), Fevicordin A-triacetat (53) und Fevicordin A-glucosid-monomethyl-ether (56): Keines der Nebenglucoside oder chemisch modifizierten Derivate hatte entzündungshemmende Eigenschaften. Unerwarteterweise wurde bei diesen Verbindungen zum Teil ein umgekehrter Effekt beobachtet. Vor allem 73 und 56 lassen einen potenzierenden Effekt auf den entzündlichen Prozeß erkennen.

Tabelle 25 faßt die Ergebnisse zusammen (s. S. 143).

Tabelle 25: Einfluß der Verbindungen 20, 43, 73, 77, 78, 52, 53 und 56 auf das Carrageenan-induzierte Rattenpfotenödem nach peroraler Applikation von 10 mg/kg [175].

Substanz	Hemmung (%)	Potenzierung (%)
20	40	-
43	44	-
73	-	26
77	-	2
78	-	9.5
52	-	9.0
53	0.6	-
56	-	13

Diese Ergebnisse, die sicherlich noch präzisiert werden müssen, deuten auf einen spezifischen entzündungshemmenden Angriffspunkt von 20 und 43 hin; 20 könnte dabei ein "Prodrug" für 43 sein.
Die beobachteten toxischen Nebenwirkungen von 20 und 43 sind nicht unbedenklich: Festgestellt wurde eine starke diureseblockierende Wirkung, die bereits im antiinflammatorisch wirksamen Dosisbereich auftritt.
Dieser Effekt ist zur Zeit Gegenstand näherer Untersuchungen. Von ihrem Ergebnis wird abhängen, ob an den potentiellen Einsatz von Fevicordin A-glucosid als Antiphlogistikum gedacht werden kann.

Da zur Lokalbehandlung von Pilzerkrankungen der Haut u.a. auch Desinfektionsmittel wie Thymol und Salicylsäure eingesetzt werden [2], also Verbindungen mit phenolischen Strukturelementen, und auch Brenzcatechin als desinfizierend beschrieben wird [176] haben wir die Frage nach einer antifungischen Aktivität dieser "Brenzcatechine" und anderer Verbindungen der Fevicordin-Reihe im Plattendiffusionstest geprüft. Test-Mikroorganismus war Saprolegnia asterophora. Parallel mit 43 und 88, den genuinen Fevicordinen A und B, wurden auch Brenzcatechin (110), 6,7-Dimethoxy-tetralon-2 (58), Fevicordin A-triacetat (53), Fevicordin A-dimethylether (57) und Fevicordin A-glucosid (20) getestet.

Tabelle 26 faßt die Ergebnisse zusammen:

Tabelle 26: Testung auf antifungische Aktivität der Verbindungen 43, 88, 110, 58, 53, 57 und 20 im Plattendiffusionstest (Teststamm: Saprolegnia asterophora, de Bary CBS 180.44)

Substanz	Dosis [µg]	Molekulargewicht	Hemmhof [mm]
43	100 10 1	542	15 10 Spur
88	100 10 1	542	15 10 Spur
110	100 10 1	110	35 23 Spur
58	100 10 1	206	18 12 Spur
53	100 10 1	668	5 5 Spur
57	100 10 1	570	12 8 Spur
20	100	704	-

Sowohl 43 als auch 88 zeigten deutliche antifungische Aktivität. Fevicordin A-dimethylether (57) war geringfügig weniger wirksam, wogegen die Hemmwirkung von 53, das Triacetat von Fevicordin A, deutlich abfiel.
Fevicordin A-glucosid (20) erwies sich als nicht antifungisch wirksam gegen Saprolegnia.
Bei Berücksichtigung der unterschiedlichen Molekulargewichte entspricht die molare Wirksamkeit von 43 und 88 derjenigen des Brenzcatechins.

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß die ethnologischen Berichte über eine orale Anwendung von Fevillea cordifolia - Samen gegen rheumatische Beschwerden [55] anhand der durchgeführten pharmakologischen Untersuchungen bestätigt werden können: Norcucurbitan Fevicordin A (43) kann nach den bisher vorliegenden Erkenntnissen als Träger der Wirkung angesehen werden.

3. EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 Geräte und Methoden

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden auf einem KOFLER-Heiztischmikroskop der Firma REICHERT bestimmt und sind unkorrigiert.

Drehwerte

Die Drehwerte wurden mit einem automatischen Polarimeter der Firma PERKIN ELMER (Typ 241) gemessen (Schichtdicke 10 cm).

Infrarot-Spektren

Zur Aufnahme der IR-Spektren wurde ein Gerät der Firma PERKIN ELMER (Typ 457) verwendet. Es wurde mit einer Ausgleichsküvette in $CHCl_3$ p.a. bzw. als Substanzfilm oder KBr-Preßlinge gemessen.

Elektronenspektren

Die Aufnahme der Elektronenspektren erfolgte mit einem Gerät der Firma ZEISS (Typ DMR 21). Lösungsmittel war immer Methanol p.a., falls nicht anders vermerkt.

^{1}H-NMR-Spektren

Zur Aufnahme der ^{1}H-NMR-Spektren wurden verwendet: FT-NMR-Spektrometer FX 90 Q (JEOL) bei 89.55 MHz, FT-NMR-Spektrometer GX 400 (JEOL) bei 399.65 MHz, WM 250 (BRUKER-PHYSIK) bei 250.1 MHz. Innerer Standard war TMS; angegeben sind δ-Werte in ppm.

^{13}C-NMR-Spektren

Zur Aufnahme der ^{13}C-NMR-Spektren wurden verwendet: FT-NMR-Spektrometer FX 90 Q (JEOL) bei 22.5 MHz, FT-NMR-Spektrometer GX 400 (JEOL) bei 100.41 MHz, WP 80 (BRUKER-PHYSIK) bei 20.10 MHz.

Massenspektren

Massenspektren in EI-Technik wurden mit den Geräten FINNIGAN 4000 (Ionenquellentemperatur ca. 230°C) und FINNIGAN 4500 (Ionenquellentemperatur ca. 120° C) aufgenommen.
Einlaßsystem: Schubstange
Ionisierungsenergie: 70 eV
DCI-MS mit Reaktandgas NH_3 wurden aufgenommen mit den Geräten FINNIGAN 4500 und VARIAN MAT 44 S, Fadenheizstrom bei Verdampfung ca. 650 mA, Quellendruck $1x10^{-5}$ Torr.
Hochaufgelöste MS-Daten wurden mit den Geräten VARIAN MAT 312 und VARIAN MAT 311 nach dem peak-matching-Verfahren gemessen, bei einer Auflösung von M/Δ M=10.000.
Für GC-MS-Versuche diente das Gerät FINNIGAN 4000; Kapillarsäule: Fused silica SE 30(30 m), Fa. J & W, Filmdicke 0,3 µm, Trägergas Helium mit 10 PSI, Temperaturprogramm: 80 - 200° C, 4°/Min. Weiterhin wurden 2 MS-Versuche mit einem Flugzeitmassenspektrometer (Eigenbau des Instituts für Experimentalphysik, Universität Erlangen), unter Californiumbeschuß durchgeführt.

Säulenchromatographie

Folgende Adsorbentien kamen zum Einsatz:
Kieselgel 60 (SiO_2) (Korngröße kleiner als 230 mesh), Fa. MACHERY-NAGEL;
Fractogel PVA 500®, Fa. MERCK
Sephadex LH-20®, Fa. PHARMAZIA

Dünnschichtchromatographie

a) Kieselgel:
DC-Alufolien KG 60 F_{254} (Schichtdicke 0,2 mm), Fa. MERCK
Nanoplatten SIL-20/UV_{254}, Fa. MACHERY-NAGEL

b) Kieselgel/$AgNO_3$:
Nanoplatten SIL-20/UV_{254} (MACHERY-NAGEL) wurden mit 0.1 N-$AgNO_3$-Lösung besprüht, 5 Minuten unter Lichtausschluß bei 90° C getrocknet und dann verwendet (Entwicklung der analytischen Dünnschichtchromatogramme erfolgte ebenfalls unter Lichtausschluß).

c) Silanisiertes KG:
DC-Fertigplatten KG 60 F_{254} silanisiert (Schichtdicke 0.25 mm), Fa. MERCK

d) Kieselgur hydrophob:

Zur Herstellung der Platten wurde Kieselgur G verwendet, (Schichtdicke 0,25 mm). Nach Lufttrocknen wurde 30 Minuten bei 105° C aktiviert und durch kurzzeitiges Einlegen in eine Lösung von 8 % dickflüssigem Parrafin in Petrolether hydrophobiert.

Zur DC auf Polyamid und Cellulose verwendeten wir Fertigfolien (Schichtdicke 0,1 mm) der Fa. MACHERY-NAGEL (Polyamid 6 UV_{254}) bzw. MERCK.

Analytische DC: Rf-Werte wurden auf Nanoplatten Sil-20/UV_{254} bestimmt. DC-Kammer: 9x10x13 cm ohne Filterpapiereinlage.

Lösungsmittel: Waren frisch destilliert; bei Lösungsmittelgemischen sind Volumenprozente angegeben.

Detektionsmittel:

UV-Licht 366 nm, 254 nm (in Verbindung mit Floureszenzindikator F_{254})
Anisaldehyd Nr. 15 nach Stahl [64]
Dragendorffs-Reagenz Nr. 89 nach Stahl [64]
Eisen-III-chlorid Nr. 93 nach Stahl [64]
Molybdatophosphorsäure-Reagenz Nr. 158 nach Stahl [64]
Cer-IV-ammoniumsulfat Nr. 39 nach Stahl [64]
Mayers Reagenz nach EUAB I/II [177]
Chlorsulfonsäure-Eisessig Nr. 49 nach Stahl [64]

Hochdruckflüssigchromatographie:

Für die HPLC stand ein GILSON-Hochdruckflüssigchromatograph zur Verfügung, bestehend aus einer Pumpe Modell 303, einem Holochrome-Detektor (variabel) und einem Probeninjektionssystem Rheodyne.

Verwendete Säulen waren Lichrosorp RP-18,7 µ (Länge: 25 cm, Ø: 20 mm bzw. Länge: 25 cm, Ø: 4 mm).

Gaschromatographie:

Verwendet wurde das Modell 5720 A mit FID der Fa. HEWLETT-PACKARD, Trennsäule: 1,8 m x 2 mm i.D., Glassäule mit 4 % Polyethylenglykolsuccinat auf Chromosorb G AW DMCS, 80 - 100 mesh. Säulentemperatur: 80 - 200°, 4°/min., Injektor- und Detektortemperatur: 250° C, Trägergas: 36 ml/min N_2.

Standard-Methylierungen

Substanzen wurden in 5-20 ml wasserfreiem Aceton gelöst und mit 50 - 500 mg frisch geglühtem Kaliumcarbonat und 0.2 - 5 ml Jodmethan 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde filtriert und das Filtrat nach Einengen im Vakuum in ca. 10 ml Chloroform aufgenommen. Nach 30 min. Stehenlassen bei Raumtemperatur wurde erneut filtriert und das durch Einengen im Vakuum gewonnene Rohprodukt spezifisch gereinigt.

Standard-Acetylierung

Substanzen wurden bei Raumtemperatur in 2 - 5 ml Gemisch aus Pyridin (p.a.) und Acetanhydrid gerührt. Dann wurde im Vakuum eingeengt, mehrmals mit Chloroform oder Methanol aufgenommen und erneut eingeengt, bis Pyridin und Acetanhydrid/Essigsäure entfernt waren. Das Rohprodukt wurde jeweils spezifisch gereinigt.

Verwendete Abkürzungen für Lösungsmittel

Ac = Aceton, EMK = Ethylmethylketon, E= Ethanol, B = Benzol, C = Chloroform, CH = Cyclohexan, EE = Essigester, M = Methanol, PE = Petrolether 60 - 70, Tol = Toluol, T = Tetrachlorkohlenstoff, W = Wasser

Zuordungen von ^{13}C-NMR-Resonanzen

Die Zuordnung für die C-Atome 9/12, 13/14, 26/27 können gegebenenfalls umgekehrt sein; andere eventuell umgekehrte Zuordnungen sind durch *, **, usw. gekennzeichnet, δ- Werte sind in ppm angegeben.

Zuordnungen von ^{1}H-NMR-Resonanzen

Die Zuordnung für die Protonen der Methylgruppen 19/21 und 26/27 können gegebenenfalls umgekehrt sein, δ-Werte sind in ppm angegeben.

3.2 Pflanzenmaterial

Das untersuchte Pflanzenmaterial (Samen von Fevillea cordifolia) wurde in Costa Rica gesammelt und in mehreren Sendungen von 1982 - 1984 nach

Deutschland gesandt. Die Samen wurden nach Ankunft gefriergetrocknet (Trocknungsverlust: 20 %). Ein beispielhaftes Exemplar liegt unter der Herbar-Nr. 8213 im Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Erlangen/Nürnberg , aus.

3.2.1 Vorbereitung zur Extraktion

Mit Hilfe eines Messers wurden die Samen von der harten, braunen Außenschale befreit. Durch Abschaben der den Kernen (=Endosperm) noch anhaftenden Haut gewann man das weiche Innere der Samen, das für die nachfolgende Extraktion eingesetzt wurde. Dieses Material wurde mit flüssigem Stickstoff gefroren und auf einer Retschmühle "mittelfein" gemahlen. Aus 100 g Samen (ca. 5 Stück) gewinnt man etwa 65 g Extraktionsgut.

3.2.2 Extraktion

1. Extraktion:

540 g zerkleinertes Material wurden in einem Soxhlet-Extraktor mit Petrolether 50/70 (5 l) drei Tage lang bei Normaldruck und Siedetemperatur extrahiert. Nach Abziehen des Lösungsmittels i. Vak. verblieb ein Rückstand von 300 g (55,5 %). Dieser Extrakt erhielt die Bezeichnung B.
Anschließend wurde das Extraktionsgut mit Methanol (5 l) drei Tage lang bei Normaldruck und Siedetemperatur extrahiert. Nach Abziehen des Lösungsmittels i. Vak. verblieb ein Rückstand von 70 g (13 %). Dieser Rückstand erhielt die Bezeichnung A.

2. Extraktion:

Eine spätere Lieferung wurden unter den oben genannten Bedingungen extrahiert. Jedoch wurde nach der Extraktion mit Petrolether noch ein Tag mit Methylenchlorid (3 l, Normaldruck, Siedetemperatur) extrahiert.

Aus 800 g zerkleinertem Material wurden
460 g Petrolether - Extrakt (57,5 %) = Extrakt PE,
4 g Methylenchlorid - Extrakt (0,5 %) = Extrakt C,
100 g Methanol - Extrakt (12,5 %) = Extrakt D gewonnen.

Herstellung von Extrakt E:
Der methanolische Extrakt D wurde mit dem 2-Phasengemisch C-M-W 5/6/4 ausgeschüttelt. Einengen der unteren Phase i. Vak. nach Trocknen über Natriumsulfat ergab Extrakt E. Aus 10 g Extrakt D erhielt man 4 g Extrakt E.

3.2.3 Vorversuche

Zwei Gramm des Extraktes A (siehe Abschnitt 3.2.2) wurden in 100 ml Methanol-Wasser 1/1 aufgenommen und je 5 mal mit 25 ml folgender Lösungsmittel ausgeschüttelt: Tetrachlorkohlenstoff, Diethylether, Methylenchlorid und Essigester.
Die organischen Phasen trocknete man vor dem Einengen i.Vak. über Natriumsulfat. Die einzelnen Extrakte wurden für dünnschichtchromatographische Untersuchungen verwendet.
DC-Systeme:

Kieselgel: C-M: 98/2, 95/5, 90/10, 85/15, 80/20, 70/30, 60/40
C-M-W: 7/2/1 (u. Ph.), 7/3/1 (u. Ph.), 6/3/1 (u. Ph.), 5/4/1 (u. Ph.)
C-E-W: 8/3/1 (u. Ph.), 8/2/1 (u. Ph.)
EE-M: 98/2, 95/5, 90/10, 85/15
Ac-M: 98/2, 95/5

Polyamid: C-M: 95/5, 90/10
M-EMK: 80/20

Sil. KG: E-W: 30/50, 1/1
M-W: 60/40, 1/1

$KG/AgNO_3$: C-M: 90/10

Für die Untersuchung von Extrakt C wurden folgende DC-Systeme verwendet:

Kieselgel: C-M: 99/1, 98/2, 95/5
T-M: 99/1, 98/2, 95/5
CH-EE: 70/30, 60/40, 50/50
PE-Ac: 80/20, 70/30, 60/40
Tol-M: 98/2, 95/5
Tol-EE: 80/20, 70/30

Für die Untersuchung von Extrakt B und PE wurde folgendes System verwendet:

Kieselgur G/hydrophob: Ac-Eisessig 7/3

Die entwickelten Platten wurden im UV-Licht betrachtet und mit einem der in Abschnitt 3.1 genannten Sprühreagenzien behandelt.

3.2.4 Trennung der Rohextrakte

Der Gang der chromatographischen Auftrennung der Rohextrakte A,C,D,E (siehe Abschnitt 3.2.2, S.150) und der Fraktionen BR II/III und BR IV (s. S.159) ist schematisch in Abb. 32, S. 153, wiedergegeben.

3.2.5 Beschreibung der chromatographischen Trennungen

Nr. 1 - 24
Fraktion A (60 g); jeweils aufgetragene Menge: 2,5 g
Adsorbens: 200 g LH-20
Laufmittel: M-C 7/3
Säulenparameter: Ø: 4 cm; L: 90 cm;
erhaltene Fraktionen:
1: 270-320 ml (3 g)
2: 320-350 ml (7,5 g)
3: 350-380 ml (29 g)
4: 380-420 ml (15 g)
5: 420-480 ml (3 g)

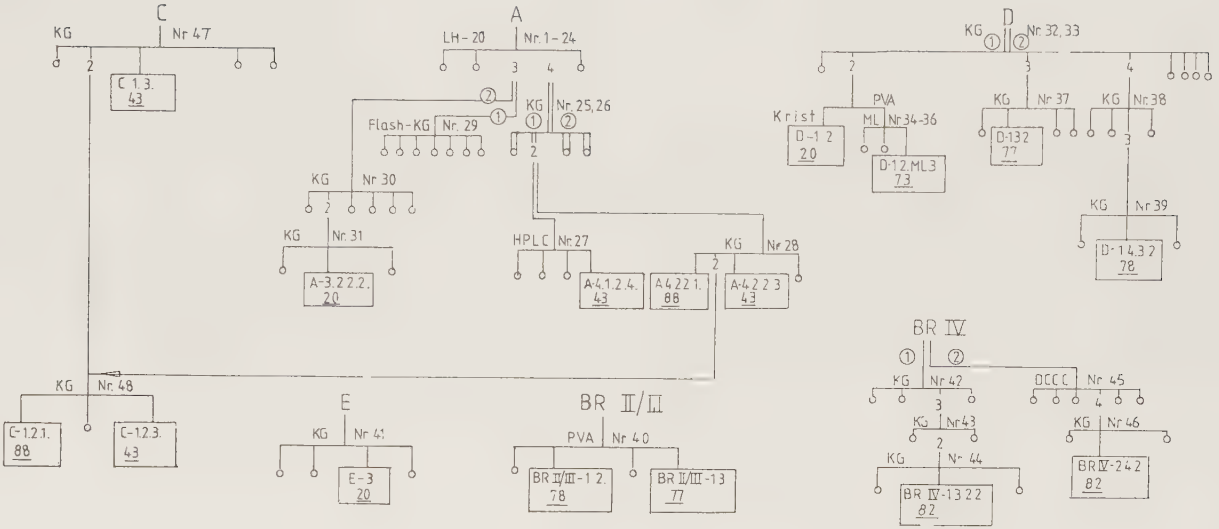


Abb. 32: Trennungsschema der Rohextrakte A,C,D,E und der Fraktionen BR II/III und BR IV

Nr. 25

Fraktion A-4.1 (5 g): Adsorbens: 500 g KG
Laufmittel: T-M 9/1
Säulenparameter: Ø: 4 cm; L: 1 m;
erhaltene Fraktionen:
1: 500-1000 ml (0,1 g)
2: 1000-1550 ml (0,35 g)
3: 1550-2900 ml (0,37 g)
4: + M* (3,7 g)

Nr. 26

Fraktion A-4.2 (5 g) Adsorbens: 500 g KG
Laufmittel: C-M 9/1
Säulenparameter: Ø: 4 cm; L:1 m;
erhaltene Fraktionen:
1: 500-860 ml (0,1 g)
2: 860-960 ml (0,4 g)
3: 960-2000 ml (0,32 g)
4: + M* (3,7 g)

Nr. 27

Fraktion A-4.1.2 (125 mg) Adsorbens: RP 18; 7 µ, Lichrosorb Ø 20 mm,
L: 25 cm
Laufmittel: M-W 6/4
Fluß: 10 ml/min (1750 psi)
Konz.: 125 mg/2 ml M
Inj.: 20 µl
erhaltene Fraktionen:
1: Retentionszeit 27-29 Minuten (8 mg)
2: Retentionszeit 29-30 Minuten (5 mg)
3: Retentionszeit 30-33 Minuten (6 mg)
4: Retentionszeit 44-56 Minuten (85 mg)
Detektion erfolgte bei 224 nm
Fraktion A-4.1.2.4 = Fevicordin A (43)

---

* + M bedeutet: mit Methanol gespült

Nr. 28

Fraktion A-4.2.2 (125 mg)

Adsorbens: 12,5 g KG
Laufmittel: Tol-M 98/2
Säulenparameter: Ø: 1 cm; L: 30 cm
erhaltene Fraktionen:
1: 130-165 ml (6 mg)
2: 165-170 ml (20 mg)
3: 170-220 ml (70 mg)
4: + M (10 mg)
Fraktion A-4.2.2.1 = Fevicordin B (88)
Fraktion A-4.2.2.3 = Fevicordin A (43)

Nr. 29

Fraktion A-3.1 (10 g)

Adsorbens: 200 g Kieselgel
Laufmittel: je 3 l C-M 98/2; C-M 95/5;
C-M 90/10; C-M 80/20;
C-M 70/30; C-M 60/40;
+ M
Säulenparameter: Ø 10 cm; ca. 20 psi Überdruck
erhaltene Fraktionen:
1: 0,15 g
2: 3,0 g
3: 1,4 g
4: 0,34 g
5: 3,4 g
6: 0,34 g
7: 0,7 g

Nr. 30

Fraktion A-3.2 (7 g)

Adsorbens: 800 g KG
Laufmittel: 2,5 l C-M-W 7/3/1 (u. Ph.)
1,5 l C-M-W 6/4/1 (u. Ph.)
Säulenparameter: Ø 6 cm; L: 70 cm

erhaltene Fraktionen:
1: 900-1150 (0,16 g)
2: 1150-1800 ml (2,4 g)
3: 1800-2300 ml (0,73 g)
4: 2300-2900 ml (0,45 g)
5: 2900-4000 ml (0,65 g)
6: + M (2,0 g)

Nr. 31

Fraktion A-3.2.2. (1,5 g)

Adsorbens: 150 g KG
Laufmittel: C-M 85/15
Säulenparameter: Ø:2,5 cm; L: 75 cm
erhaltene Fraktionen:
1: 500-615 ml (40 mg)
2: 615-900 ml (860 mg)
3: 900-1500 ml (530 mg)
Durch mehrfaches Umkristallisieren im 2-Phasengemisch C-W erhielt man aus A-3.2.2.2 400 mg reines Fevicordin A-glucosid (20).

Nr. 32

Fraktion D-1 (10 g)

Adsorbens: 800 g KG
Laufmittel: 5 l C-M-W 7/2/1 (u. Ph.)
2,5 l C-M-W 7/3/1 (u. Ph.)
1,5 l C-M-W 7/3
+ M
Säulenparameter: Ø 6 cm; L: 70 cm
erhaltene Fraktionen:
1: 1500-2900 ml (0,15 g)
2: 2900-4900 ml (2,1 g)
3: 4900-6500 ml (0,27 g)
4: 6500-7500 ml (0,64 g)
5: 7500-7900 ml (0,22 g)
6: 7900-8800 ml (0,64 g)
7: 8800-9900 ml (0,41 g)
8: + M (4,8 g)

	Aus Fraktion D-1.2 erhielt man durch mehrfaches Umkristallisieren aus C-W 1,5 g Fevicordin A-glucosid (20) und 500 mg Mutterlauge (ML)
Nr. 33	
Fraktion D-2 (10 g)	entsprechend Fraktion D-1 (Nr. 32)
Nr. 34	
Fraktion D-1.2 ML* (150 mg)	Adsorbens: 5 g PVA 500 Laufmittel: 0,1 N $AgNO_3$ - Ac 75/25 Säulenparameter: Ø: 1 cm; L: 80 cm erhaltene Fraktionen: 1: 95-110 ml (85 mg) 2: 110-130 ml (30 mg) 3: 130-160 ml (15 mg) Es wurde unter Lichtschutz gearbeitet. Nach Einengen der Fraktionen fielen aus D-1.2.ML 1 Nadeln aus (Fevicordin A-glucosid (20); D-1.2.ML.2 und D-1.2.ML.3 erhielt man durch Ausschütteln der wässrigen Phasen mit Chloroform.
Nr. 35/Nr. 36	
Fraktion D-1.2.ML (je 150 mg)	entsprechend Nr. 34 Aus den vereinigten Fraktionen D-1.2.ML.3 erhielt man nach nochmaliger KG-Passage (3 g, C-M 9/1) 40 mg Fevicordin B-glucosid (73).
Nr. 37	
Fraktion D-1.3. (370 mg)	Adsorbens: 40 g KG Laufmittel: C-E-W 8/2/1 (u. Ph.) Säulenparameter: Ø: 2,5 cm; L: 25 cm

* ML = Mutterlauge

erhaltene Fraktionen:

1: 130-160 ml (70 mg)

2: 160-250 ml (210 mg)

3: 250-370 ml (60 mg)

4: 370-500 ml (14 mg)

Aus Fraktion D-1.3.2 konnten 150 mg Fevicordin C-glucosid (77) kristallin erhalten werden.

Nr. 38

Fraktion D-1.4 (500 mg)

Adsorbens: 50 g KG
Laufmittel: C-M-W 8/2/1 (u. Ph.)
Säulenparameter: Ø: 2,5 cm; L: 30 cm
erhaltene Fraktionen:
1: 180-290 ml (100 mg)
2: 290-380 ml (250 mg)
3: 380-540 ml (80 mg)
4: + M (35 mg)

Nr. 39

Fraktion D-1.4.3 (80 mg)

Adsorbens: 10 g KG
Laufmittel: C-E-W 8/2/1 (u. Ph.)
Säulenparameter: Ø: 1 cm; L: 25 cm
erhaltene Fraktionen:
1: 20 - 45 ml (15 mg)
2: 45 - 60 ml (40 mg)
3: 60 - 75 ml (16 mg)
Aus Fraktion D-1.4.3.2 konnten 25 mg Fevicordin D-glucosid (78) kristallin erhalten werden.

Um die unter Nr.1 -Nr. 39 erhaltenen Vortrennungen bessser übersehen zu können, wurden nicht weiter bearbeitete Vorfraktionen dünnschichtchromatographisch nach Polaritätsbereichen (=BR) geordnet und zusammengegeben.

Man erhielt 7 Fraktionen (BR I - VII):

BR I: A-3.1.2; A-3.2.2; D-2.2

BR II/III: A-3.1.3; A-3.2.3; D-1.3.3; D-2.3; D-2.4

BR IV: A-3.1.4; A-3.2.4; D-1.4.4

BR V: A-3.1.5; A-3.2.5; D-1.5; D-2.5

BR VI: A-3.1.6; A-3.1.7; A-3.2.6; D-1.6; D-2.6

BR VIII: D-1.7; D-1.8; D-2.7; D-2.8

Nr. 40

Fraktion BR II/BR III-1 (600 mg)

Adsorbens: 150 g PVA 500, gequollen in EE

Laufmittel: W (EE-Gesättigt)

Säulenparameter: Ø: 4 cm;

L_{EE}: 74 cm;

L_W: 58 cm;

Tropfgeschwindigkeit: ca. 6 ml/h

erhaltene Fraktionen:

1: 180-360 ml (155 mg)

2: 360-420 ml (65 mg)

3: 420-460 ml (60 mg)

4: 460-670 ml (155 mg)

BR II/III-1.2 und BR II/III-1.4 wurden einer kurzen KG-Passage (je 3 g; FM: C-M 9/1) unterzogen, wonach aus BR II/III-1.2 40 mg Fevicordin D-glucosid (78), aus BR II/III-1.4 110 mg Fevicordin C-glucosid (77) erhalten wurden.

Nr. 41

Extrakt E (3 g)

Adsorbens: 400 g KG

Laufmittel: EE-M 90/10

Säulenparameter: Ø 4 cm; L: 80 cm

erhaltene Fraktionen:
1: 450-700 ml (0,15 g)
2: 770-880 ml (0,26 g)
3: 880-1400 ml (1,3 g)
4: + M (1,1 g)
Aus Fraktion E-3 konnte 1 g Fevicordin A-glucosid (20) kristallin (Aceton/Wasser) erhalten werden.

Nr. 42

Fraktion BR-IV.-1 (400 mg)

Adsorbens: 40 g KG
Laufmittel: EE-M 9/1
Säulenparameter: Ø: 2,5 cm, L: 20 cm
erhaltene Fraktionen:
1: 130-190 ml (60 mg)
2: 190-200 ml (195 mg)
3: 200-225 ml (70 mg)
4: 225-280 ml (70 mg)

Nr. 43

Fraktion BR-IV-1.3 (70 mg)

Adsorbens: 10 g KG
Laufmittel: C-M 85/15
Säulenparameter: Ø: 1 cm; L: 25 cm
erhaltene Fraktionen:
1: 50-90 ml (13 mg)
2: 90-115 ml (42 mg)
3: 115-150 ml (10 mg)

Nr. 44

Fraktion BR-IV-1.3.2 (42 mg)

Adsorbens: 5 g KG
Laufmittel: C-M 9/1
Säulenparameter: Ø: 1 cm; L: 12,5 cm

erhaltene Fraktionen:
1: 35 - 50 ml (7 mg)
2: 50 - 70 ml (25 mg)
3: 70 - 90 ml (6 mg)
Fraktion BR-IV-1.3.2.2 entspricht Fevicordin E-glucosid (82).

Nr. 45

Fraktion BR-IV-2 (400 mg)

DCCC
Laufmittel: C-M-W 4/4/3
stationäre Phase: C
mobile Phase: M/W; aufsteigend
Motor Contr. Pump 4; Pump Stroke 10
max. pressure: 30
Probenlösung: 400 mg in 15 ml C-M-W 4/4/3;
Flußgeschwindigkeit: ca. 9,5 ml/h
erhaltene Fraktionen:
1: 50-160 ml (40 mg)
2: 160-195 ml (20 mg)
3: 195-245 ml (25 mg)
4: 245-325 ml (90 mg)
5: 325-340 ml (15 mg)
6: + M (200 mg)

Nr. 46

Fraktion BR-IV-2.4 (90 mg)

entsprechend Nr. 43
Aus Fraktion BR-IV-2.4.2 wurden 55 g sauberes Fevicordin E-glucosid (82) erhalten.

Nr. 47

Fraktion C-1 (750 mg) Adsorbens: 75 g KG
Laufmittel: CH-EE 50/50 (entgast)
Säulenparameter: Ø: 2,5 cm; L: 30 cm
erhaltene Fraktionen:
1: 50-100 ml (340 mg)
2: 100-135 ml (80 mg)
3: 135-350 ml (60 mg)
4: 350-460 ml (40 mg)
5: + EE (180 mg)
Fraktion C-1.3 entspricht
Fevicordin A (43).

Nr. 48

Fraktion C-1.2 (vereinigt mit
Fraktion A-4.2.2.2) (100 mg) Adsorbens: 10 g KG
Laufmittel: CH-EE 7/3 (entgast)
Säulenparameter: Ø: 1 cm; L: 20 cm
erhaltene Fraktionen:
1: 90-110 ml (18 mg)
2: 110-115 ml (5 mg)
3: 115-140 ml (70 mg)
Fraktion C-1.2.1 entspricht Fevicordin B (88).
Fraktion C-1.2.3 entspricht Fevicordin A (43).

Chromatographie Nr. 47 und Nr. 48 wurden unter Lichtschutz vorgenommen. Die Belüftung des Rotationsverdampfers erfolgte mit Stickstoff.

Für Testung auf biologische Aktivität von 20, 73, 77, 78, 43 und Derivaten dieser Verbindungen wurden größere Mengen der Extrakte C, D, E und BR II/III nach oben genanntem Trennschema (s.Abb.32, S. 153) aufgearbeitet.

3.2.6 Beschreibung der isolierten Verbindungen

3.2.6.1 Glucoside

Fevicordin A-2-O-β-D-glucosid (20)

Herkunft: siehe Chromatographie Nr. 32, 34-36, 41
(geschätzter Anteil am methanolischen Rohextrakt 16 %)

DC: Rf (KG, C-M 9/1) 0.30; Rf (KG/$AgNO_3$, C-M 9/1) 0.29;
Rf (KG, EE-M 98/2) 0.31
Anisaldehyd: graubraun

Schmelzpunkt: 148° C; feine farblose Nadeln aus $CHCl_3$-W oder Ac-W

$[\alpha]_D^{21} = -23,8^\circ$ (c = 0.5 in MeOH)

UV: λ_{max} (log ε) = 285 (3.35), 224 nm (4.15), + NaOH: Verschiebung nach 295 (3.56), 237 nm (4.14);

IR (KBr): 3420 (OH), 1720 (C=O), 1685 (C=O), 1630 (C=C), 1490 (C=C), 1370 ($\underline{CH_3}$-CO), 830 cm^{-1} (CH);

^{1}H-NMR (CD_3OD, 400 MHz): Tab. 13, S. 65

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 250 MHz): Tab. 6, S. 35

^{13}C-NMR (CD_3OD, 100,41 MHz): Tab. 3, S. 35, Tab. 13, S. 65

^{13}C-NMR[off-resonance (CD_5N, 22.5 MHz)]: Tab. 3, S. 35

^{13}C-NMR[J-moduliertes Spinecho ($CDCl_3$, 20,10 MHz)]: Tab. 3, S. 35

2-dimensionale NMR-Untersuchungen (CD_3OD, GX 400):

^{1}H{^{1}H}-2D (COSY-P)-Spektrum: Abb. 6, S. 52; Tab. 10, S. 53

Pulsfolge: 90°-t-90°-Aufnahme

^1J-^{13}C{^{1}H}-Shift korreliertes 2D-Spektrum: Abb. 7, S. 57; Tab. 11, S. 58

^{13}C{^{1}H}-Shift korreliertes 2D-Spektrum (long range): Abb.8,S.62; Tab.12,S.6

Pulsfolge: 90°_H-t-180°_C-t-t_1-90°_H/90°_C-t_1-Aufnahme$_C$/Breitbandentkoppelt

($t_1 = \frac{1}{2J}$)

EI-MS: Abb. 2, S. 27

EI-MS (70 eV, Finnigan 4500):

m/z (rel. Int.) = 482 (0.5), 386 (1.0), 369 (0.9), 344 (0.9), 326 (1.3), 217 (25), 190 (15), 189 (15), 111 (30), 43 (100)

DCI-MS (Reaktandgas NH_3, Finnigan 4500):
m/z (rel. Int.) = 722 [2.5, $(M+NH_4)^+$], 662 [6.7, $(M+NH_4$-Essigsäure$)^+$], 644 [1, $(M+NH_4$-Essigsäure-$H_2O)^+$], 500 (1.5), 180 (100)

FAB-MS (Xenon, neg. Ionen):
m/z (rel. Int.) = 703 [90, (M-1)], 541 (74), 481 (60), 385 (72), 285 (24), 189 (68),

Elementaranalyse: $C_{37}H_{52}O_{13}$ (704,4) berechnet C 63.1 H 7.4 O 29.5
gefunden C 62.5 H 7.3 O 29.5

Fevicordin B-2-O-β-D-glucosid (73)

Herkunft: siehe Chromatographie Nr. 34 - Nr. 36
(geschätzter Anteil am methanolischen Rohextrakt 1.1 %)

DC: Rf (KG, C-M 9/1) 0.30; Rf (KG/$AgNO_3$, C-M 9/1) 0.31
Rf (KG,EE-M 98/2) 0.34
Anisaldehyd: hellbraun

Schmelzpunkt: 143-144° C; farblose Nadeln aus EE

$[\alpha]_D^{21} = -26.5^\circ$ (c = 0.5 in MeOH)

UV: λ_{max} (log ε) = 286 (3.35), 228 (3.86), + NaOH: Verschiebung nach 295 (3.56), 240 nm (3.88)

IR: (KBr): 3440 (OH), 1700 (C=O), 1620 (C=C), 1480 (C=C), 1370 ($\underline{CH_3}$-CO), 830 cm^{-1} (CH);

^{1}H-NMR (CD_3OD, 400 MHz) : Tab. 23. S. 112

^{13}C-NMR (CD_3OD, 22,5 MHz): Tab. 22, S. 111

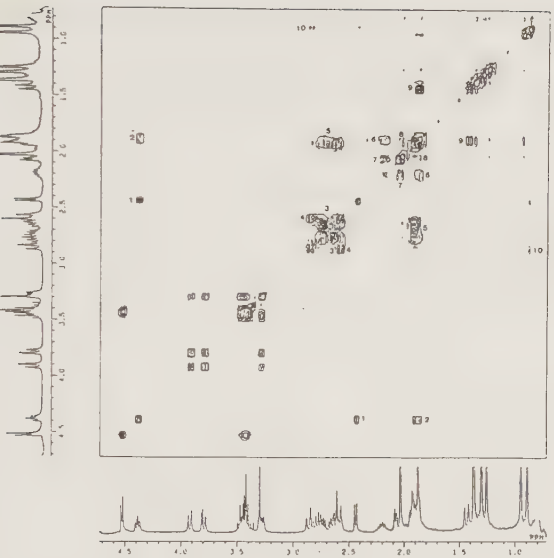
2-dimensionale NMR-Untersuchung (CD_3OD,GX 400):

$^1H\{^1H\}$-Shift korreliertes 2D (COSY-P):

Pulsfolge: 90°-t-90°-Aufnahme

Korrelationen:

Kopplung 1:	H-16	mit	H-17	Kopplung 5c:	$H\text{-}6_A$	mit	$H\text{-}7_A$
" 2:	$H\text{-}15_B$	"	H-16	" 5d:	$H\text{-}6_B$	"	$H\text{-}7_A$
" 3a:	$H\text{-}6_A$	"	$H\text{-}6_B$	" 6:	$H\text{-}7_A$	"	$H\text{-}7_B$
" 3b:	$H\text{-}23_A$	"	$H\text{-}23_B$	" 7:	$H\text{-}7_B$	"	H-8
" 4:	$H\text{-}12_A$	"	$H\text{-}12_B$	" 8:	$H\text{-}7_A$	"	H-8
" 5a:	$H\text{-}23_A$	"	$H\text{-}24_A$ und 24_B	" 9:	$H\text{-}15_A$	"	$H\text{-}15_B$
" 5b:	$H\text{-}23_B$	"	$H\text{-}24_A$ und 24_B	" 10:	$H\text{-}12_B$	"	$H\text{-}CH_3\text{-}18$



DCI-MS (Reaktandgas NH_3, Finnigan 4500):

m/z (rel. Int.)= 664 [3.1, $(M+NH_4-Essigsäure)^+$],
646 [0.5, $(M+NH_4-Essisäure-H_2O)^+$],
502 (1.0), 180 (100)

EI-MS (70 eV, Finnigan 4500):

m/z (rel. Int.)= 484 (0.5), 387 (0.5), 369 (5.0),
344 (0.35), 326 (0.15), 217 (11), 190 (21,5),
189 (18,5), 113 (30), 43 (100)

Fevicordin C-2-O-β-D-glucosid (77)

Herkunft: siehe Chromatographie Nr. 37, Nr. 40
(geschätzter Anteil am methanolischen Roxextrakt 6,7 %)

DC: Rf (KG,C-M 85/15) 0.37; Rf (KG, EE-M 95/5)) 0.35;
Anisaldehyd: graubraun

Schmelzpunkt: 172-174 ^{o} C; feine Nadeln aus $CHCl_3/CH_3OH$

$[\alpha]_D^{21} = -32,9^{o}$ (c = 0.5 in MeOH)

UV: λ_{max} (log ε) = 285 (3.35), 224 (4.15); + NaOH : Verschiebung nach 295 (3.56), 232 nm (4.14)

IR: (KBr): 3380 (OH), 1690 (Schulter, C=O), 1680 (C=O), 1622 (C=C), 1480 (C=C), 830, 760 cm^{-1}

^{1}H-NMR (CD_3OD, 400 MHz): Tabelle 23, S. 112

^{13}C-NMR (CD_3OD, 400 MHz): Tabelle 22, S. 111

DCI-MS (Reaktandgas NH_3, Finnigan 4500):

m/z (rel. Int.) = 680 $[1,1(M+NH_4)^+]$, 662 $[2,8(M+NH_4-H_2O)^+]$, 644 $[1,0(M+NH_4-2H_2O)^+]$, 518 (1,0), 500 (2,0), 180 (100)

Fevicordin D-2-O-β-D-glucosid (78)

Herkunft: siehe Chromatographie Nr. 39, Nr. 40

(geschätzter Anteil am methanolischen Rohextrakt 4 %)

DC: Rf (KG, C-M 85/15) 0,34, Rf (KG, EE-M 95/5) 0,28

Anisaldehyd: hellbraun

Schmelzpunkt: 157-158° C, sehr feine Nadeln aus EE

$[\alpha]_D^{21}$ = -28,8° (c = 0,5 in MeOH)

UV: λ_{max} (log ε) = 285 (3.35), 228 (3.85), + NaOH: Verschiebung nach 295 (3.56), 240 nm (3.87)

IR: (KBr): 3400 (OH), 1680 (C=O), 1610 (Schulter, C=C), 1480 (C=C), 822 cm^{-1}

^{1}H-NMR (CD_3OD, 400 MHz): Tabelle 23, S. 112

^{13}C-NMR (CD_3OD, 22,5 MHz): Tabelle 22, S. 111

DCI-MS (Reaktandgas NH_3, Finnigan 4500):

m/z (rel. Int.) = 682 $[1,0\ (M+NH_4)^+]$, 664 $[1,1\ (M+NH_4-H_2O)^+]$, 180 (100)

Fevicordin E-2-O-β-D-glucosid (82)

Herkunft: siehe Chromatographie Nr. 44, Nr. 46

(geschätzter Anteil am methanolischen Rohextrakt 0,6 %)

DC: Rf (KG, C-M 85/15), 0,28; Rf (KG, EE-M 9/1) 0,45;

Anisaldehyd: blau

Schmelzpunkt: 159-161° C; sehr feine Nadeln aus EE

$[\alpha]_D^{21}$ = -4,1°, (c=0,3 in MeOH);

UV: λ_{max} (log ε) = 285 (3.35), 224 (3.85), + NaOH: Verschiebung nach 295 (3.56), 243 nm (3.88)

IR: (KBr): 3400 (OH), 1730 (C=O), 1610 (Schulter, C=C), 1480 (C=C), 830 cm^{-1}

^{1}H-NMR (CD_3OD, 400 MHz): Abb. 25, S. 109

^{13}C-NMR (CD_3OD, 22,5 MHz): Tab.24, S.122

DCI-MS (Reaktandgas NH_3, Finnigan 4500), Abb. 26, S.120

m/z (rel. Int.) = 666 $[1(M+NH_4)^+]$, 648 $[6,6(M+NH_4-H_2O)^+]$, 566 $[5,9(M+NH_4-100)^+]$, 180 (100)

3.2.6.2 Genuine Aglyka

Fevicordin A (43)

Herkunft: siehe Chromatographie Nr. 27, Nr. 28, Nr. 47, Nr. 48 (geschätzter Anteil am CH_2Cl_2-Extrakt 20 %)

Die Substanz erwies sich dünnschichtchromatographisch und bei HPLC-Mischinjektionen als identisch mit dem Aglykon von Fevicordin A-glucosid (siehe Abschnitt 3.2.7.1, S. 168). Drehwert, UV, IR, ^{13}C-NMR-Spektrum, ^{1}H-NMR-Spektrum und MS stimmten mit den Fevicordin-A-Daten überein.

HPLC: t_R (RP-18, 7µ, M/W 6/4, 1 ml/min, 1100 psi) 22 min, Det. 224 nm

Fevicordin B (88)

Herkunft: siehe Chromatographie Nr. 28, Nr. 48 (geschätzter Anteil am CH_2Cl_2 - Extrakt 1,5 %)

DC: Rf (KG, C-M 98/2) 0,3; Rf (KG, CH-EE 6/4) 0,43; Anisaldehyd: hellbraun

Beschreibung: weiße amorphe Substanz, die sich an der Luft und in Lösung schnell gelb färbt;

$[\alpha]_D^{21} = +6,8^\circ$ (c=0,4 in MeOH)

UV: λ_{max} (log ε) = 286 (3.37), 228 (3.86), + NaOH: Verschiebung nach 325 (3.39), 300 (3.50), 246 nm (3.80),

IR: (KBr): 3400 (OH), 1700 (C=O), 1620 (Schulter, C=C), 1490 (C=C), 1370 cm^{-1} ($\underline{CH_3}$-CO);

^{1}H-NMR (C_6D_6, 400 MHz): δ = 0.95 (s,3 H), 1.08 (s,3 H), 1.18 (s,3 H), 1.35 (s,3 H), 1.40 (s,3 H), 1.43 (s,3-4 H), 1.68 (s,3 H), 1.50-2.00 (m, ca. 4 H), 2.17 (s,3 H, CH_3-28), 2.10-2.40 (m,4 H), 2.30 (d,J=7 Hz, 1 H, H-17), 2.50-2.60 (m, 1 H), 2.63-2.82 (m, 1H), 2.70 (d,J=15 Hz, 1 H, H-12_A), 2.80 (d,J= 15 Hz, 1H,H-12_B), 3.98 (bt, 1 H, H-16), 4.52 (s,1 H, OH), 5.73 (s, 1 H, OH), 6.70 (s,1 H, H-1).

^{13}C-NMR (C_6D_6, 22.5 MHz): δ = 11.6 (C-28), 20.1 (C-30), 20.1 (C-7), 20.4 (C-18), 22.3 ($\underline{C}H_3$-CO), 24.6 (C-6), 25.3 (C-21), 26.2 (C-26), 26.3 (C-27), 29.1 (C-19), 32.8 (C-23), 35.9 (C-24), 44.3 (C-8), 46.5 (C-15), 49.3 (C-14), 51.3 (C-13), 52.0 (C-12), 52.0 (C-9), 59.8 (C-17), 71.6 (C-16), 80.9 (C-20), 83.1 (C-25), 110.5 (C-1), 124.5 (C-4), 130.0 (C-10), 127.0 (C-5), 142.3 (C-3)*, 143.8 (C-2)*, 172.3 (CH_3-$\underline{C}$OO), 217.1 (C-22)**, 216.6 (C-11)**

EI-MS (70 eV, Finnigan 4500):
m/z (rel. Int.) = 484 (16.3), 386 (14.3), 369 (15.3), 217 (33.5), 190 (67.4), 189 (64.4), 113 (32.7), 43 (100)

3.2.7 Beschreibung der hergestellten Derivate

3.2.7.1 Glucosid-Derivate

Enzymatische Spaltung von Fevicordin A-2-O-β-D-glucosid (20) zur Verbindung 43

Mit Cellulase:

150 mg Fevicordin A-glucosid (0,21 mmol) wurden in wenigen Tropfen

Methanol gelöst und unter ständigem leichten N_2-Strom mit 750 mg Cellulase (900 CU/mg, Fa. Roth) in 15 ml H_2O bidest. gelöst, versetzt. Man ließ 24 Stunden bei RT rühren, verdünnte dann mit 85 ml H_2O und schüttelte 5 x mit je 50 ml Toluol aus. Die vereinigten Toluol-Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und unter Lichtschutz und mit N_2-Belüftung i. Vak. eingeengt: 95 mg weißes, amorphes Fevicordin A (43) (63 %).

Die wässrige Phase wurde 5 x mit je 50 ml Essigester extrahiert; nach Trocknen und Einengen konnten 30 mg nicht umgesetztes 20 zurückgewonnen werden (20 %).

Mit β-Glucosidase: 1000 E/mg (Fa. Fluka)

Pufferlösung: 50 ml 0,1 mol Kaliumhydrogenphthalat-Lösg. (0,1 mol entspricht 2,042 g/100 ml) + 22,6 ml 0,1 mol NaOH-Lsg: pH= 5,0 (Statt Acetatpufferlösung, pH= 5,0, wie bei Müller und Auterhoff [96] angegeben.)

100 mg Fevicordin-A-glucosid wurden unter den oben genannten Bedingungen zur Glucolyse angesetzt. Statt Cellulase-Lösung wurden 250 mg β-Glucosidase in 10 ml Kaliumhydrogenphthalat-Pufferlösung zugesetzt. Die Aufarbeitung erfolgte wie oben beschrieben.

Ausbeute: 8 mg (8 %) Fevicordin A (43)
87 mg nicht gespaltene Ausgangsverbindung (87 %);

DC: Rf (KG, C-M 98/2) 0.30; Rf (KG, CH-EE 6/4) 0.37;
Anisaldehyd: graubraun

Beschreibung: weiße amorphe Substanz, die sich an der Luft und in Lösung schnell gelb färbt;

$[\alpha]_D^{21}$ = + 15.5° (c = 0.5 in MeOH)

UV: λ_{max} (log ε) = 287 (3.37), 226 (4.11), + NaOH: Verschiebung nach 325 (3.39), 300 (3.50), 242 nm (4.03)

IR: (KBr): 3420 (OH), 1720 (C=O), 1680 (C=O), 1620 (C=C), 1510 (Schulter, C=C), 1370 ($\underline{CH_3}$-CO)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): Tab. 15, S. 71

^{1}H-NMR (C_6D_6, 400 MHz): δ = 1.04 (s,3 H), 1.06 (s,3 H), 1.26 (s,3 H), 1.30 (s,3 H), 1.32 (s,3 H), 1.40 (s,3-4 H), 1.58 (s,3 H), 1.60-1.92 (m,ca.2 H),

2.17 (s,3 H, CH_3-28), 2.10-2.40 (m, 3 H), 2.46 (d,J=7 Hz, 1 H, H-17), 2.42-2.55 (m,1 H), 2.75 (d,J=15 Hz, 1 H, H-12_A), 2.80 (d,J=15 Hz, 1 H, H-12_B), 4.25 (bt, 1 H, H-16), 4.48 (s, 1 H,OH) 5.80 (bs, 1H, OH), 6.50 (d,J=16 Hz, 1 H, H-23), 6.73 (s, 1 H, H-1), 7.20 (d,J=16 Hz, 1 H, H-24)

^{13}C-NMR (C_6D_6, 22.5 MHz): Tab. 14, S. 70)

DCI-MS (Reaktandgas Isobutan, VARIAN MAT 44 S):

m/z (rel. Int.) = 483 [100,$(M+H-Essigsäure)^+$];
465 [38,$(M+H-Essigsäure-H_2O)^+$];

DCI-MS (Reaktandgas NH_3, VARIAN, MAT 44 S):

m/z (rel. Int.) = 560 [100,$(M+NH_4)^+$];

EI-MS (70 eV, Finnigan 4500):

m/z (rel. Int.) = 482 (0.8), 386 (2.7), 369 (0.5), 217 (6), 190 (13.6), 189 (12.9), 175 (5.8), 96 (28.8), 43 (100)

MS-Hochauflösung: (VARIAN, MAT 312):

$C_{29}H_{38}O_6$	gef. 482,26543	ber. 482,26684
$C_{23}H_{30}O_5$	gef. 386,20854	ber. 386,20932
$C_{23}H_{29}O_4$	gef. 369,20484	ber. 369,20658
$C_6H_8O_1$	gef. 96,05766	ber. 96,05751

Acetylierung von Fevicordin-A-2-O-β-D-glucosid (20) zur Verbindung 52

100 mg 20 wurden nach der Standardmethode acetyliert und das Produkt chromatographisch gereinigt (10 g SiO_2, Säulendurchmesser: 1 cm, Lm: Tol-M 95/5):90 mg 3,16,2',3',4',6'-Hexa-O-acetyl-fevicordin-A-2-O-β-D-glucosid (52)

DC: Rf (KG C-M 99/1) 0,44; Rf (KG Tol-M 95/5) 0,26;
Anisaldehyd: graubraun

Schmelzpunkt: 193-195° C, kubische Kristalle aus Methanol

$[\alpha]_D^{21} = -41,5^o$ (c = 0.5 in $CHCl_3$);

UV: λ_{max} (log ε) = 280 (3.17), 224 (4.16), + NaOH: Verschiebung nach 300 (3.17), 280 (3.32), 234 nm (4.14)

IR: (KBr): 3440 (OH), 1740 (C=O), 1690 (C=O), 1625 (C=C), 1480 (C=C), 1380 cm^{-1} ($\underline{CH_3}$-C=O)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 250 MHz): δ = 1.00 (s,3 H,CH_3-18), 1.08 (s,3 H,CH_3-30), 1.40 (s,3 H,CH_3-19), 1.42 (s,3 H,CH_3-21), 1.56 (s,6 H,CH_3-26/27), 1.85 (s,3 H, CH_3-CO), 1,97 (s,3 H,CH_3-CO), 2.02 (s,3 H, CH_3-CO), 2.04 (s,3 H,CH_3-CO), 2.06 (s,3 H, CH_3-CO), 2.10 (s,3 H, CH_3-CO), 1.85-2.15 (m, ca. 3 H, H-7_A, H-8, H-15_B), 2.17 (s,3 H,CH_3-28), 2.28 (s,3 H, =C-OCO-CH_3), 2.68 (d,J=7 Hz, 1H, H-17), 2.78 (d,J= 15 Hz, 1 H, H-12_A), 2.90 (d,J=15 Hz,1 H, H-12_B), 2.50-2.90 (m,3 H,H-6_A,H-6_B,H-7_B), 3.90 (m, 1 H, H-5'), 4.25 (dd, J_1=12, J_2= 4 Hz, 1 H, H-6_A'), 4.33 (dd, J_1=12, J_2=2 Hz, 1 H,H-6_B'), 4.95 (d,J=8 Hz, 1 H, H-1'), [5.16 (bt + m, 2H), 5.39 (m, 2 H), H-16, H-2', H-3',H-4'],6.38 (d,J=16 Hz, 1 H, H-23), 6.66 (s,1 H, H-1),7.15 (d,J=16 Hz, 1 H, H-24)

^{1}H-NMR (C_6D_6, 250 MHz): δ = 0.85 (s,3 H), 1.05 (s,3 H), 1.25 (s,3 H), 1.32 (s,3 H), 1.33 (s,3 H), 1.38 (s,3 H), 1.58 (s,3 H), 1.67 (s,3 H), 1.69 (s,3 H), 1.87 (s,6 H), 1.90 (s,3 H), 1.92 (s,3 H), 1.70-2.00 (m, ca. 3 H), 2.17 (s,3H,CH_3-28) 2.10-2.25 (m,2H), 2.45 (d,J=15 Hz, 1 H, H-12_A), 2.30-2.50 (m, 1 H), 2.64 (d,J=7 Hz, 1 H, H-17), 2.73 (d,J=15 Hz, 1 H,H-12_B), 3.67 (m, 1 H, H-5'), 4.30 (dd,J_1=12, J_2=4 Hz, 1 H, H-6_A'), 4.38 (s,1H, OH), 4.48 (dd,J_1=12, J_2 = 2 Hz, 1 H, H-6_B') 5.21 (d,J=8 Hz,1 H, H-1'

[5.30 (dd,J_1=J_2=9 Hz, 1 H), 5,47 (dd,J_1=J_2=9 Hz + bt, 2 H), 5.62 (dd,J_1=J_2=9 Hz, 1 H) H-16, H-2', H-3', H-4'], 6.52 (d,J=16 Hz, 1 H, H-23), 7.03 (s,1H, H-1), 7.25 (d,J=16 Hz, 1H, H-24)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 20,10 MHz): Tab. 17, S. 85

^{13}C-NMR [J-moduliertes Spinecho ($CDCl_3$, 20,10 MHz)]:

δ = 12.1 (C-28), 19.1-21.8 (C-30,C-7,C-18, 7 x $\underline{C}H_3$-CO), 23.5 (C-21), 24.0 (C-6), 26.4 (C-26), 26.6 (C-27), 29.5 (C-19), 42.0 (C-8), 43.0 (C-15), 48.6 (C-13), 49.4 (C-14), 50.9 (C-9), 51.2 (C-12), 54.0 (C-17), 61.8 (C-6'), 68.1 (C-4'), 70.6 (C-2'), 72.3 (C-5'), 72.8 (C-3'), 73.7 (C-16), 77.8 (C-20), 79.2 (C-25), 98.5 (C-1'), 109.6 (C-1), 119.4 (C-23), 129.1 (C-5*), 130.4 (C-4*), 135.4 (C-10), 137.0 (C-3), 146.3 (C-2), 152.6 (C-24), 168.7-170.8 (7xCH_3-$\underline{C}$OO), 201.0 (C-22), 213.4 (C-11)

EI-MS (70 eV, Finnigan 4500):

m/z (rel. Int.) = 331 (8.5), 271 (2.0), 211 (1.8), 169 (68.9), 145 (4.8), 109 (46,9), 103 (3.0)

DCI-MS (Reaktandgas NH_3, Finnigan 4000):

m/z (rel. Int.) = 974 [100$(M+NH_4)^+$], 914 [1.9$(M+NH_4$-Essigsäure$)^+$], 331 (21,2)

Reduktion von Fevicordin A-2-O-β-D-glucosid (20) mit Natriumborhydrid

110 mg 20, gelöst in 10 ml Methanol, wurden portionsweise mit 60 mg Natriumborhydrid versetzt (ca. 10-molarer Überschuß). Nach Beendigung der Wasserstoffentwicklung wurde das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur noch 16 Stunden gerührt. Nach dieser Zeit war das Ausgangsmaterial umgesetzt (DC-Kontrolle). Nach Hydrolyse des überschüssigen $NaBH_4$ mit 20 ml H_2O wurde der Ansatz 5 x mit je 15 ml Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen, über Na_2SO_4 getrocknet, engte man i. Vak. ein.

Dünnschichtchromatographische Untersuchung zeigte, daß mehrere Produkte entstanden waren; das Hauptprodukt, Fraktion 20 -Red.1: Rf (KG, C-M 9/1) = 0.25, hatte eine schwächere UV-Löschung als die Ausgangsverbindung [Vergleich: Rf = (KG, C-M 9/1) = 0.30]; beim Besprühen mit Anisaldehyd-Reagenz färbte Fraktion 20-Red.1 als bräunlicher Fleck mit gelbem Saum an.

Aus der gleichen Polarität dieses Produktgemisches schloß man, daß es sich um die beiden diastereomeren 20-22-Diole von 20 handelte, die in vergleichbarer Menge entstanden waren.

Eine Reihe von Nebenprodukten, Fraktion 20-Red.2: Rf (KG, C-M 85/15) = 0.30-0.10 trennte man chromatographisch von 20-Red.1 ab (10 g SiO_2, Säulendurchmesser 1 cm, Lm: C-M 85/15. Das Gemisch der zwei Hauptprodukte 20-Red.1 wurde gemeinsam eluiert und ergab zusammen 85 mg (77 % Ausbeute).

Acetylierung von Fraktion 20-Red-1 zu den Verbindungen 65 und 66

85 mg 20-Red.1 wurden nach der Standardmethode acetyliert und chromatographisch aufgetrennt.

Adsorbens: 10 g SiO_2

Laufmittel: Tol-MeOH 90/10

Säulenparameter: Ø 1 cm, L: 20 cm

erhaltene Fraktionen:

1: 58 mg (90-120 ml) 65 (68 % Ausbeute)

2: 20 mg (130-160 ml) 66 (23,5 % Ausbeute)

Physikalische und spektroskopische Daten von 65

DC: Rf (KG, C-M 98/2)0.51; Rf (KG,Tol-M 9/1) 0,27;
Anisaldehyd: dunkelblau

Beschreibung: amorphe farblose Substanz

$[\alpha]_D^{21} = -36,6^{\circ}$ (c=0,7 in $CHCl_3$)

UV λ_{max} (log ε) = 280 (3.10); + NaOH: Verschiebung nach 300 (3.20), 280 nm (3.30);

IR: (KBr): 1750 (C=O), 1700 (C=O), 1600 (C=C), 1480 (C=C), 1370 cm^{-1} ($\underline{CH_3}$-C=O)

^{1}H-NMR (C_6D_6, 400 MHz): δ = 1.00 (s,3 H), 1.12 (s,3 H), 1.14 (s,3 H), 1.34 (s,6 H), 1.35 (s,3 H), 1.50 (s,3-4 H), 1.67 (s,3 H), 1.68 (s,3 H), 1.77 (s,3 H), 1.87 (s,3 H), 1.95 (s,3 H), 1.99 (s,3 H), 2.07 (s,3 H), 1.60-2.07 (m, ca. 3 H), 2.17 (s,3 H,CH_3-28), 2.10-2.25 (m, 2 H), 2.40-2.50 (m, 1 H), 2.60 (d,J=15 Hz, 1 H, H-12$_A$), 2.71 (d,J=7 Hz, 1 H, H-17), 2.80 (d,J=15 Hz, 1 H, H-12$_B$), 3.60 (m, 1 H,H-5') 4.30 (dd, J_1=12, J_2=4 Hz, 1 H, H-6$_A$) 4.50 (dd, J_1=12, J_2=2 Hz,1 H, H-6$_B$'), 5.08 (d,J=8 Hz, 1 H, H-1'), 5.16 (d,J=8 Hz, 1 H, H-22), [5.30 (dd,J_1=J_2=9 Hz,1 H), 5.44 (m,2 H), 5.63 (dd,J_1=J_2= 9 Hz, 1 H), H-2', H-3', H-4', H-23)], 5.97 (d,J=16 Hz,1 H, H-24), 6.03 (bt,1 H, H-16), 7.05 (s,1 H, H-1)

^{13}C-NMR [off resonance ($CDCl_3$, 22,5 MHz)]:
δ = 12.07 (C-28), 19.3-21.8 (C-30,C-7,C-18 + 8 x $\underline{CH_3}$-CO), 22.2 (q), 24.0 (C-6), 25.1 (q), 27.9 (q), 29.6 (C-19), 41.9 (C-8), 43.0 (C-15), 48,4 (C-13), 49.4 (C-14), 50.6 (C-9), 51.5 (C-12), 52.6 (C-17), 61.8 (C-6'), 68,1 (C-4'), 70.6 (C-2'), 72.3 (C-5'), 72.8 (C-3'), 74.3 (C-16)*, 74.7 (C-22)*, 78.8 (C-20), 79.8 (C-25), 98.5 (C-1'), 109.6 (C-1), 122.6 (C-23)

129.1 (C-5)**, 130.2 (C-4)**, 135.6 (C-10),
136.9 (C-3), 141.0 (C-24), 146.2 (C-2),
168.4-170.7 (8xCH_3-$\underline{C}$OO), 213.8 (C-11)

MS: DCI-MS (Reaktandgas NH_3, Finnigan 4500):
m/z (rel. Int.) = 958 [18.5 (M+NH_4-Essigsäure)$^+$];
818 (5.2), 331 (22.5), 158 (100)

MS (Californiumbeschuß, Flugzeitmassenspektrometer):
m/z = 1040 [(M+Kalium)$^+$], 1024 [(M+Natrium)$^+$]

Physikalische und spektroskopische Daten von 66:

DC: Rf (KG,C-M 98/2) 0.33; Rf (KG,Tol-M 9/1) 0.18;
Anisaldehyd: mittelblau

Schmelzpunkt: 214° C; feine Nadeln aus Methanol (4° C);
$[\alpha]_D^{21}$ = -25,1° (c=0.5 in $CHCl_3$)

UV: λ_{max} (log ε) = 280 (3.10), + NaOH: Verschiebung nach 300 (3.20)
280 nm (3.30)

IR: (KBr): 1740 (C=O), 1690 (C=O), 1600 (C=C), 1470 (Schulter, C=C),
1370 cm^{-1} (CH_3-C=O)

^{1}H-NMR (C_6D_6, 400 MHz): $\overline{\delta}$ = 0.99 (s,3 H), 1.13 (s,3 H), 1.28 (s,3 H),
1.32 (s,3 H), 1.38 (s,3 H), 1.41 (s,3 H),
1.53 (s,3-4 H), 1.64 (s,3 H), 1.66 (s,3 H),
1.71 (s,3 H), 1.87 (s,3 H), 1.88 (s,3 H),
1.90 (s,3 H), 1.99 (s,3 H), 1.60-2.08 (m,
ca. 3 H), 2.14 (s,3 H, CH_3-28), 2.06-2.20
(m, 2 H), 2.40-2.50 (m, 1 H), 2.73 (d,J= 7 Hz,
1 H, H-17), 3.00 (d,J=15 Hz,1 H, H-12_A),
3.18 (d,J=15 Hz,1 H, H-12_B), 3.58 (m,1 H,
H-5'), 4.32 (dd,J_1=12,J_2=4 Hz,1 H, H-6_A')
4.48 (dd,J_1=12,J_2=2 Hz,1 H,H-6_B'), 5.07
(d,J=8 Hz,1 H, H-1'), [5.20-5.32 (m,2 H),
5.45-5.55 (m,3 H), H-2', H-3', H-4', H-22,
H-23)], 5.98 (bt,1 H,H-16), 6.16 (J=16 Hz,
1 H, H-24) 7.06 (s,1 H, H-1).

^{13}C-NMR [off resonance-Spektrum (C_6D_6, 22.5 MHz)]:

δ = 12.2 (C-28), 19.4-21.1 (C-30, C-7, C-18 + 8 + $\underline{C}H_3$-CO), 22.0 (q), 23.5 (C-6), 25.0 (q), 28.1 (q), 29.0 (C-19), 42.2 (C-8), 43.8 (C-15), 48.8 (C-13), 49.6 (C-14), 51.0 (C-9), 51.2 (C-12), 52.0 (C-17), 61.8 (C-6'), 68.3 (C-4'), 71.3 (C-2'), 72.4 (C-5'), 73.2 (C-3'), 75.5 (C-16), 75.5 (C-22), 77.9 (C-20), 79.4 (C-25), 99.0 (C-1'), 110.3 (C-1), 125.1 (C-23), 129.1 (C-5)*, 130.4 (C-4)*, 136.6 (C-10), 137.8 (C-3), 139.7 (C-24), 147.2 (C-2), 168.2-169,6 (8 x CH_3-$\underline{C}$OO), 213.4 (C-11)

DCI-MS: (Reaktandgas NH_3, Finnigan 4500):

m/z (rel. Int.) = 958 [2.3 (M+NH_4-Essigsäure)$^+$]; 818 (1.0); 331 (40,5); 158 (100)

MS (Californiumbeschuß, Flugzeitmassenspektrometer):

m/z = 1040 [(M+Kalium)$^+$]
1024 [(M+Natrium)$^+$]

Methylierung von Fevicordin-A-2-O-β-D-glucosid (20) zur Verbindung 56

100 mg 20 wurden nach Standardmethode methyliert und das Produkt chromatographisch gereinigt (10 g SiO_2, Säulendurchmesser 1 cm, Lm: C-M 9/1): 70 mg 3-O-Methyl-fevicordin A-2-O-β-D-glucosid (56)

DC: Rf (KG, C-M 9/1) 0.49; Rf (KG, EE-M 98/2), 0.33;
Anisaldehyd: graubraun

Schmelzpunkt: 125-127° (aus Essigester)

$[\alpha]_D^{21}$ = -33.8° (c = 0.5 in MeOH)

UV: λ_{max} (log ε) = 280 (3.11), 224 nm (4.17); + NaOH: Keine Verschiebung

IR: (KBr): 3440 (OH), 1720, 1690 (C=O), 1620, 1480 (C=C), 1370 cm^{-1} ($\underline{C}H_3$-C=O);

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 250 MHz): δ = 1.02 (s,3 H,CH_3-18), 1.04 (s,3 H, CH_3-30), 1.32 (s,3 H,CH_3-19), 1.41 (s,3 H, CH_3-21), 1.50 (s,3 H,CH_3-26), 1.52 (s,3 H, CH_3-27), 1.80-2.00 (m,2 H,H-7_A,H-15_B), 1.99 (s,3 H, CH_3-CO), 2.10 (s,3-4 H,CH_3-28, H-8), 2.20 -2.30 (m,1 H, H-7_B), 2.45 (d,J=7 Hz,1 H, H-17),2.60-2.70 (m,1 H,H-6_A), 2.75 (d,J= 15 Hz, 1 H, H-12_A), 2.70-2.80 (m,1 H,H-6_B), 2.88 (d,J=15 Hz,1 H, H-12_B), 3.40-3.70 (m,4 H, H-2', 3', 4', 5'), 3.81 (s,3 H, OCH_3), 3.92 (dd,1 H,J_1=12,J_2=4 Hz, 1 H, H-6_A'), 4.08 (dd,J_1=12, J_2=2.5 Hz, 1 H, H-6_B'), 4.30 (bt, 1 H, H-16), 4.80 (d,J=7.5 Hz, 1 H, H-1'), 6.40 (d,J=16 Hz, 1 H, H-23), 6.83 (s,1 H, H-1), 7.02 (d,J=16 Hz,1 H, H-24)

^{13}C-NMR (CD_3COCD_3, 22.5 MHz): Tabelle 18, S.92

^{13}C-NMR (CD_3COCD_3, 22.5 MHz):

δ = 11.8 (C-28), 19.9 (C-30), 19.9 (C-7), 20.3 (C-18), 21.8 ($\underline{C}H_3$-CO), 24.4 (C-6)*, 24.9 (C-21)*, 26.5 (C-26), 26.9 (C-27), 29.1 (C-19), 43.3 (C-8), 46.1 (C-15), 49.4 (C-14), 50.8 (C-13), 51.6 (C-9), 51.6 (C-12), 59.0 (C-17), 60.9 (OCH_3), 62.6 (C-6'), 71.2 (C-4'), 71.3 (C-16), 74.5 (C-2'), 77.4 (C-3'), 78.1 (C-5'), 79.4 (C-20), 80.0 (C-25), 102.6 (C-1'), 113.5 (C-1), 122.2 (C-23), 130.0 (C-4)**, 130.8 (C-5)**, 134.3 (C-10), 147.2 (C-2)**, 148.8 (C-3)**, 151.0 (C-24), 170.1 (CH_3-$\underline{C}$OO), 203.4 (C-22), 214.6 (C-11)

EI-MS (70 eV, Finnigan 4500):
m/z (rel. Int.) = 496 (≤1), 400 (5), 383 (5), 358 (8), 340 (5), 231 (9,2), 204 (36.4), 203 (47.4), 111 (93,7), 43 (100);

DCI-MS (Reaktandgas NH_3, Finnigan 4500):
m/z (rel. Int.) = 736 (1.0), 676 (1.3), 514 (1.9), 496 (1.1), 400 (3.4), 299 (1.9), 180 (100);

Überführen von Fevicordin A-2-O-β-D-glucosid (20) in Verbindung 73
100 mg 20 wurden in 3 ml Methanol gelöst und 2 Stunden am Pd/A-Kohle (10 %)-Kontakt hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde i. Vak. eingeengt und chromatographisch gereinigt (10 g SiO_2, Lm: EE-M 98/2): 75 mg Hydrierungsprodukt, dessen physikalische Daten identisch mit denen von 73 waren.

Enzmatische Spaltung von Fevicordin B-2-O-β-D-glucosid (73) zur Verbindung 88
20 mg 73 wurden mit 100 mg Cellulase in H_2O bidest. zur enymatischen Spaltung angesetzt. Es wurden die gleichen Bedingungen eingehalten wie bei der Glucolyse von Fevicordin A-glucosid (20) angegeben sind (s. S. 168). Nach Einengen der Toluol-Phase i.Vak. erhielt man 12 g Aglucon (Ausbeute: 60 %).
Die Substanz erwies sich dünnschichtchromatographisch, in seinen physikalischen und spektroskopischen Daten als identisch mit Fevicordin B (88).

Acetylierung von Fevicordin B-2-O-β-D-glucosid (73) zur Verbindung 75 :
100 mg 73, (aus 20 durch Hydrierung gewonnen) wurden nach der Standardmethode acetyliert und chromatographisch gereinigt (10 g SiO_2, Säulendurchmesser 1 cm, Lm: Tol-M 95/5): 91 mg amorphes, farbloses 3,16,2',3', 4', 6'-Hexa-O-acetyl-fevicordin-B-2-O-β-D-glucosid (75)

DC: Rf (KG,C-M) 99/1) 0.40; Rf (KG, Tol-M 95/5) 0.23;
Anisaldehyd: hellbraun

Beschreibung: amorphes, farbloses Pulver

$[\alpha]_D^{21} = -43,7^\circ$ (c=0.5 in $CHCl_3$)

UV: λ_{max} (log ε) = 280 nm (3.17); + OH^- = 300 (3.17); 280 nm (3.32)

IR: (KBr): 3440 (OH), 1740 (C=O), 1600 (C=C), 1475 (C=C), 1370 cm^{-1} ($\underline{CH_3}$-C=O);

^{1}H-NMR: (C_6D_6): (250 MHz): δ = 0.78 (s,3 H), 1.00 (s,3 H), 1.17 (s,3 H), 1.33 (s,3 H), 1.34 (s,3 H), 1.40 (s+d,4 H), 1.65 (s,6 H), 1.67 (s,3 H), 1.81 (s,3 H), 1.89 (s,3 H), 1.91 (s,3 H), 1.95 (s,3 H), 1.60-2.00 (m, ca. 5 H), 2.10-2.25 (m, 2 H), 2.17 (s,3 H,CH_3-28), 2.34 (d,J=15 Hz, 1 H, H-12_A), 2.30-2.60 (m,3 H), 2.52 (d,J= 7 H, 1 H, H-17), 2.67 (d,J= 15 Hz,1 H, H-12_B), 3.66 (m,1 H, H-5'), 4.20 (s,1 H, OH), 4.28 (dd,J_1=12,J_2=4 Hz,1 H, H-6_A'),4.47 (dd, J_1=12,J_2=2Hz, 1H, H-6_B'), 5.23 (d,J=8Hz, 1 H, H-1'), [5.30 (dd,J_1=J_2=9Hz,1 H), 5.36 (bt,1 H), 5.49 (dd,J_1=J_2=9 Hz,1 H), 5.63 (dd,J_1=J_2=9 Hz,1 H) H-2',H-3',H-4', H-16], 7.00 (s,1 H, H-1)

^{13}C-NMR: ($CDCl_3$, 22.5 MHz):δ = 12.1 (C-28), 19.1-22.3 (C-30,C-7,C-18 + 7x $\underline{CH_3}$-CO), 23.9 (C-21)*, 24.3 (C-6)*, 25.8 (C-26), 26.1 (C-27), 29.4 (C-19), 30.5 (C-23), 35.3 (C-24), 42.0 (C-8), 43.2 (C-15), 48.6 (C-13), 49.5 (C-14), 51.0 (C-9), 51.2 (C-12), 54.2 (C-17), 61.8 (C-6'), 68.2 (C-4'), 70.7 (C-2'), 72.4 (C-5'), 72.9 (C-3'), 74.2 (C-16), 78.8 (C-20), 80.9 (C-25), 98.1 (C-1'), 109.6 (C-1), 129.0 (C-5)**, 130.4 (C-4)**, 135.4 (C-10), 137.1 (C-3), 146,4 (C-2), 165.5-170.6 (7xCH_3-$\underline{C}$OO), 212.3 (C-22)***, 213.1 (C-11)***

DCI- MS: (Reaktandgas NH_3, Finnigan 4500):
m/z (rel. Int.) = 976 [100 $(M+NH_4)^+$],
916 [4 $(M+NH_4$-Essigsäure$)^+$], 331 (49);

Methylierung von Fevicordin B-2-O-β-D-glucosid (73) zur Verbindung 76
100 mg 73 (durch Hydrierung von 20 gewonnen) wurden nach der Standardmethode methyliert und chromatographisch gereinigt (10 g SiO_2, Säulendurchmesser 1 cm, Lm: C-M 9/1): 80 mg, 3-O-Methyl-fevicordin B-2-O-β-D-glucosid (76).

DC: Rf (KG, C-M 9/1) 0.49; Rf (KG, EE-M 98/2) 0.29;
Anisaldehyd: hellbraun

Beschreibung: amorphes, weißes Pulver
$[\alpha]_D^{21}$ = -31.5 (c=0.5 in MeOH);

UV: λ_{max} (log ε) = 280 nm (3.11), + NaOH: keine Verschiebung

IR: (KBr): 3440 (OH), 1700 (C=O), 1590 (C=C), 1475 (C=C), 1370 cm^{-1} ($\underline{CH_3}C=O$),

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.99 (s,3 H,CH_3-18), 1.01 (s,3 H,CH_3-30), 1.30 (s,3 H,CH_3-19), 1.39 (s,3 H,CH_3-21), 1.40 (s,3 H,CH_3-26), 1.41 (s.3 H,CH_3-27), 1.50 (d,J=15 Hz, 1 H, H-15_A), 1.80-2.10 (m,2 H,H-7_A,H-15_B), 1.93 (s,3 H,CH_3-CO), 2.10 (s,3 H,CH_3-28), 2.13 (d,J=8 Hz,1 H, H-8), 2.20-2.30 (m,1 H,H-7_B), 2.40-2.90 (m,2 H,H-6_A,H-6_B), 2.50 (d,J=7 Hz,1 H, H-17), 2.75 (d,J=15 Hz,1 H,H-12_A), 2.90 (d,J=15 Hz,1 H, H-12_B), 3.40-3.70 (m,4 H, H-2',H-3',H-4', H-5'), 3.75 (s,3 H,OCH_3), 3.93 (dd,J_1=12,J_2=4 Hz,1 H, H-6_A'), 4.08 (dd,J_1=12,J_2=2.5 Hz,1 H,H-6_B'), 4.30 (bt,1 H,H-16), 4.79 (d,J=7.5 Hz,1 H, H-1'), 6.75 (s,1 H,H-1).

^{13}C-NMR (CD_3OD, 22,5 MHz): δ = 11.9 (C-28), 20.1 (C-30), 20.1 (C-7), 20.4 (C-18), 22.3 ($\underline{C}H_3$-CO), 24.7 (C-6), 25.4 (C-21), 26.2 (C-26), 26.3 (C-27), 29.1 (C-19), 32.7 (C-23), 35.8 (C-24), 43.9 (C-8), 46.3 (C-15), 49.8 (C-14), 51.1 (C-13), 52.1 (C-12), 52.3 (C-9), 59.7 (C-17), 61.3 (OCH_3), 62.3 (C-6'), 71.1 (C-16), 71.4 (C-4'), 74.8 (C-2'), 77.8 (C-3'), 78.2 (C-5'), 80.8 (C-20), 82.9 (C-25), 102.9 (C-1'), 113.2 (C-1), 130.6 (C-4)*, 131.6 (C-5)*, 134.9 (C-10), 147.4 (C-2)**, 149.3 (C-3)**, 172.2 (CH_3-$\underline{C}OO$) 216.4 (C-11)**, 216.7 (C-22)**.

DCI-MS (Reaktandgas NH_3, Finnigan 4500):
m/z (rel. Int.) = 738 [7.5 $(M+NH_4)^+$], 678 [32.1 ($M+NH_4$-Essigsäure)$^+$], 661 (3.9), 660 (2.8), 516 (9.7), 180 (100);

Acetylierung von Fraktion D-1.4.2 zu den Verbindungen 80 und 81

250 mg Fraktion D-1.4.2 (siehe Chromatographie Nr. 38), die aus Fevicordin C-2-O-β-D-glucosid und Fevicordin D-2-O-β-D-glucosid zusammengesetzt war, wurden nach der Standardmethode acetyliert. Die beiden entstandenen Acetylierungsprodukte wurden chromatographisch getrennt und gereinigt (35 g SiO_2, Säulendurchmesser 2,5 cm; Tol-M 9/1).
Fraktionen:
(180-240 ml) D-1.4.2.Ac.1: 70 mg 3,16,2',3',4',6'-Hexa-O-acetyl-fevicordin C-2-O-β-D-glucosid (80)
(300-390 ml) D-1.4.2.Ac.3: 40 mg 3,16,2',3',4',6'-Hexa-O-acetyl-fevicordin D-2-O-β-D-glucosid (81)
Fraktion D-1.4.2.Ac.2 enthielt ein Gemisch der oben genannten Produkte (120 mg).

3,16,2',3',4',6' - Hexa-O-acetyl-fevicordin C-2-O-β-D-glucosid (80)

DC: Rf (KG,C-M 98/2) 0.23; Rf (KG,Tol-M 9/1) 0.18;
Anisaldehyd: graubraun

Schmelzpunkt: 138° (Methanol)

$[\alpha]_D^{21} = -47.9^\circ$ (c=0.5 in $CHCl_3$);

UV: λ_{max} (log ε) = 280 (3.18), 224 nm (4.15), + NaOH: Verschiebung nach 295 (3.45), 234 nm (4.14)

IR: (KBr): 3460 (OH), 1740 (C=O), 1680 (C=O), 1620 (C=C), 1480 (C=C), 1370 cm^{-1} ($\underline{CH_3}$-CO);

^{1}H-NMR (C_6D_6, 400 MHz): δ = 0.84 (s,3 H), 0.98 (s,6 H), 1.08 (s,3 H), 1.28 (s,3 H), 1.35 (s,3 H), 1.40 (d,J=15 Hz, 1 H,H-15_A), 1.66 (s,3 H), 1.68 (s,3 H), 1.70 (s,3 H), 1.86 (s,3 H), 1.93 (s,6 H), 1.60-2.00 (m,ca. 3 H), 2.10-2.25 (m,2 H), 2.17 (s,3 H,CH_3-28), 2.31 (d,J=15 Hz,1 H, H-12_A), 2.30-2.50 (m,1 H), 2.61 (d,J=7 Hz, 1 H, H-17), 2.66 (d,J=15 Hz,1 H, H-12_B), 3.81 (m,1 H,H-5'), 4.31 (dd,J_1=12,J_2=4 Hz, 1 H, H-6_A'), 4.46 (dd,J_1=12,J_2=2 Hz,1 H, H-6_B'), 4.58 (s,1 H,OH-), 5.31 (d,J=8 Hz, 1 H, H-1'), [5.33 (dd,J_1=J_2=9 Hz,1 H),5.40 (bt,1 H),5.55 (dd,J_1=J_2=9 Hz,1 H), 5.66 (dd,J_1=J_2=9 Hz,1 H), H-2',H-3',H-4',H-16], 6.81 (d,J=16 Hz,1 H,H-23), 7.03 (s,1 H, H-1), 7.05 (d,J=16 Hz, 1 H, H-24)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 22,5 MHz):

δ = 12.1 (C-28), 19.2-20.6 (C-30,C-7,C-18, + 6 x $\underline{CH_3}$-CO), 23.6 (C-21)*, 24.0 (C-6)*, 29.5 (C-26), 29.5 (C-27), 29.5 (C-19), 42.0 (C-8), 43.0 (C-15), 48.7 (C-13), 49.5 (C-14), 51.0 (C-9), 51.1 (C-12), 54.0 (C-17), 61.9 (C-6'), 68.2 (C-4'), 70.7 (C-2'), 72.2 (C-5'), 72.8 (C-3'),

73.9 (C-16), 70.8 (C-25), 77.8 (C-20), 98.5 (C-1'), 110.0 (C-1), 118.7 (C-23), 129.2 (C-5)**, 130.4 (C-4)**, 135.5 (C-10), 137.1 (C-3), 146.2 (C-2), 155.5 (C-24), 168.5-170.8 (6 x CH_3-$\underline{C}$OO), 201.5 (C-22, 213.5 (C-11)

DCI-MS (Reaktandgas NH_3, Finnigan 4500):
m/z (rel. Int.) = 932 $\left[100(M+NH_4)^+\right]$, 914 $\left[9.8(M+NH_4-H_2O)^+\right]$, 331 (48.5)

3,16,2',3',4',6' - Hexa-O-acetyl-fevicordin-D-2-O-β-D-glucosid (81)

DC: Rf (KG,C-M 98/2) 0.22; Rf (KG, Tol-M 9/1) 0.15;
Anisaldehyd: hellbraun

Schmelzpunkt: 158-159° C (aus Methanol)

$[\alpha]_D^{21} = -49.5^\circ$; (c=0.5)

UV λ_{max} (log ε) = 280 nm (3.18), + NaOH: Verschiebung nach 295 nm (3.47);

IR: (KBr): 3440 (OH), 1750 (C=O), 1610 (Schulter, C=C), 1485 (C=C), 1370 cm^{-1} ($\underline{C}H_3$-C=O)

^{1}H-NMR: (C_6D_6, 400 MHz): δ = 0.75 (s,3 H), 0.98 (s,3 H), 1.01 (s,3 H), 1.04 (s,3 H), 1.21 (s,3 H), 1.33 (s,3 H), 1.38 (d,J=15 Hz, 1H, H-15_A), 1.66 (s,3 H), 1.68 (s,3 H), 1.80 (s,3 H), 1.90 (s,3 H), 1.93 (s,3 H), 1.96 (s,3 H), 1.60-2.00 (m, ca. 5 H), 2.10-2.25 (m, 2 H), 2.17 (s,3 H, CH_3-28), 2.36 (d,J=15 Hz,1 H, H-12_A), 2.30-2.50 (m,1 H), 2.56 (d,J=7 Hz, 1 H, H-17), 2.71 (d,J=15 Hz,1 H, H-12_B), 2.60-2.80 (m,2 H), 3.73 (m,1 H, H-5'), 4.21 (dd,J_1=12,J_2=4 Hz,1 H, H-6_A'), 4.43 (s, 1 H, OH-), 4.49 (dd,J_1=12,J_2=2Hz,1 H, H-6_B'), 5.30 (d,J=8 Hz,1 H, H-1'),

[5.33 (dd,J_1=J_2=9 Hz,1 H), 5.38 (bt,1H), 5.51 (dd,J_1=J_2=9 Hz,1 H),5.66 (dd,J_1=J_2= 9 Hz,1 H), H-2',H-3',H-4',H-16],7.01 (s,1 H,H-1).

^{13}C-NMR (C_6D_6, 22.5 MHz):δ = 12.1 (C-28), 19.2-20.8 (C-30,C-7,C-18 + 6 x $\underline{C}H_3$-CO),24.0 (C-21)*, 24.4 (C-6)*, 29.7 (C-26), 29.7 (C-27), 29.7 (C-19), 31.2 (C-23), 37.5 (C-24), 42.0 (C-8), 43.5 (C-15), 48.7 (C-13), 49.7 (C-14), 51.0 (C-9), 51.4 (C-12), 54.4 (C-17), 61.8 (C-6'), 68.5 (C-4'), 71.3 (C-2'), 72.8 (C-5'), 73.0 (C-3'), 74.4 (C-16), 69.3 (C-25), 79.2 (C-20), 98.5 (C-1'), 110.0 (C-1), 129.1 (C-5)**, 130.5 (C-4)**, 135.7 (C-10), 137.4 (C-3), 146.7 (C-2), 168.5 - 170.4 (6 x $CH_3\underline{C}OO$), 212.9 (C-22),*** 213.9 (C-11)***

DCI-MS (Reaktandgas NH_4, Finnigan 4500):
m/z (rel. Int.) = 934 [100$(M + NH_4)^+$], 916 [4.3$(M + NH_4-H_2O)^+$], 331 (23,8)

Acetylierung von Fevicordin E-2-O-β-D-glucosid (82) zur Verbindung 87

11 mg Fevicordin E-glucosid (82) wurden nach der Standardmethode acetyliert und chromatographisch gereinigt (5 g SiO_2, Säulendurchmesser 1 cm, Lm: C-M 95/5): 10 amorphes 3,16,2',3',4',6'-Hexa-O-acetyl-fevicordin E-2-O-β-D-glucosid (87) (91 % Ausbeute)

DC: Rf (KG, C-M 95/5) 0.24; Rf (KG, Tol-M 85/15) 0.14
Anisaldehyd: blau

Beschreibung: amorphes, weißes Pulver

$[\alpha]_D^{21}$ = - 8.4° (c = 0.4 in $CHCl_3$)

UVλ_{max}(log ε) = 280 nm (3.14); + NaOH: Verschiebung nach 300 (3.02), 280 (3.28)

IR: ($CHCl_3$): 3600 (OH), 1760 (C=O), 1690 (C=O), 1600 (C=C), 1450 (C=C), 1370 cm^{-1} ($\underline{CH_3}$-C=O)

^{1}H-NMR (C_6D_6, 400 MHz): δ = 0.90 (s,3 H), 1.02 (s,3 H), 1.10 (s,3 H), 1.16 (s,3 H), 1.18 (s,3 H), 1.40 (s,3 H), 1.52 (d,J=15 Hz,1 H), 1.65 (s,3 H), 1.70 (s,3 H), 1.80 (s,3 H), 1.90 (s,3 H), 1.93 (s,3 H), 1.98 (s,3 H), 2.18 (s,3 H), 1.60 -2.30 (m, ca. 8 H), 2.40-2.60 (m,1 H), 2.50 (d,J=15 Hz,1 H, H-12_A), 2.80 (d,J=15 Hz, 1 H, H-12_B), 3.70 (m,1 H,H-5'), 4.32 (dd, J_1=12,J_2=4 Hz,1 H,H-6_A'), 4.50 (dd,J_1=12, J_2=2 Hz,1 H, H-6_B'), 5.20 (d,J=8 Hz, 1 H, H-1'), [5.30 (dd,J_1=J_2=9 Hz, 1 H), 5.45 (dd,J_1=J_2=9 Hz,1 H), 5.55-5.78 (m,3 H), H-2',H-3',H-4',H-23,H-24], 5.80 (bt,1 H, H-16), 7.05 (s,1 H, H-1)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 22.5 MHz): Tab. 24, S. 122

DCI-MS (Reaktandgas NH_3, Finnigan 4500):
m/z (rel. Int.) = 918 [7.9 $(M+NH_4)^+$], 331 (52.2), 279 (100)

Überführen von Fevicordin-C-2-O-β-D-glucosid (77) in Verbindung 78

20 mg 77, gelöst in 3 ml Methanol wurden mit 5 mg Pd/A-Kohle (10 %) 2 Stunden lang unter Rühren bei Raumtemperatur und Normaldruck hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde chromatographisch gereinigt (5 g SiO_2, Säulendurchmesser 1 cm, Lm: C-M 85/15). Man erhielt 17 mg Dihydroprodukt (85 % Ausbeute), dessen physikalische und spektralen Daten mit Fevicordin D-2-O-β-D-glucosid (78) übereinstimmten.

Überführen von Fevicordin A-2-O-β-D-glucosid (20) in Verbindung 77

20 mg 20 wurden in 10 ml methanolischer K_2CO_3-Lösung (G/V) gerührt. Nach weitgehendem Verschwinden der Ausgangsverbindung (ca. 8 Stunden) wurde i.Vak. eingeengt, dann mit 10 ml H_2O versetzt und 5 x mit je 5 ml Essigester ausgeschüttelt. Die organischen Phasen trocknete man über Na_2SO_4 und destillierte das Lösungsmittel i.Vak. ab. Man nahm mit wenigen Tropfen Methanol wieder auf und trug auf eine präparative Platte (SiO_2, Schichtdicke 0.50 mm) auf. Als Vergleichsverbindung wurde 77 auf einer zweiten präparativen Platte aufgetragen und beide Dünnschichtchromatogramme im Fließmittelsystem C-M 85/15 entwickelt. Die SiO_2-Zone in Rf-Höhe von 77 wurde nach chromatographischer Auftrennung des Reaktionsansatzes abgeschabt und mit Methanol extrahiert. Man erhielt 4 mg Verbindung (20 % Ausbeute), deren physikalische und spektroskopische Daten identisch waren mit derjenigen von Fevicordin C-2-O-β-D-glucosid (77).

3.2.7.2 Aglyka-Derivate

Vorbemerkung: Derivatisierungen von 43 und 88 wurden unter N_2-Atmosphäre und Lichtschutz vorgenommen.

Acetylierung von Fevicordin A (43) zur Verbindung 53

100 mg 43 wurden nach der Standardmethode acetyliert und chromatographisch gereinigt (10 g SiO_2, 1 cm Säulendurchmesser, Lm: CH-EE 7/3): 70 mg 2,3,16-Tri-O-acetyl-fevicordin A (53)

DC: Rf (KG, CH/EE 7/3) 0.24; Rf (KG,Tol/EE 75/25) 0.33;
Anisaldehyd: graubraun

Beschreibung: weiße amorphe Substanz, die sich in Gegenwart von KG-Spuren und Methanol schnell gelblich färbt;

$[\alpha]_D^{21} = -35{,}8^{\circ}$ (c=0.4 in $CHCl_3$);

UV: λ_{max} (log ε) = 278 nm (3.12), 224 nm (4.11), + NaOH: Verschiebung nach 324 (3.12), 297 (3.52), 235 nm (4.09);

IR: (KBr): 3430 (OH); 1760 (C=O); 1690 (C=O); 1600 (C=C); 1480 (Schulter, C=C); 1370 cm^{-1} ($\underline{CH_3}$-C=O);

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.95 (s,3 H,CH_3-18), 1.04 (s,3 H, CH_3-30), 1.38 (s,6 H,CH_3-19,CH_3-21), 1.58 (s,6 H,CH_3-26,CH_3-27), 1.88 (s,3 H, CH_3-CO), 2.05 (s,3 H,CH_3-CO), 2.17 (s,3 H, CH_3-28), 1.85-2.20 (m,3 H, H-7_A, H-8, H-15_B), 2.26 (s,3 H, =C-OCO-CH_3), 2.32 (s,3 H, =C-OCO-CH_3), 2.65 (d,J=7 Hz, 1 H, H-17), 2.60-2.95 (m,3 H, H-6_A,H-6_B, H-7_B), 2.78 (d,J=15 Hz,1 H, H-12_A), 2.95 (d,J=15 Hz,1 H, H-12_B), 5.14 (bt,1 H, H-16) 6.35 (d,J=16 Hz,1 H, H-23), 6.70 (s,1 H, H-1), 7.13 (d,J=16 Hz, 1 H, H-24)

^{13}C-NMR (C_6D_6, 22.5 MHz): Tabelle 17, S. 85

^{13}C-NMR (C_6D_6, 22,5 MHz): δ = 12.5 (C-28), 19.1-21.3 (C-30,C-7,C-18, + 4 x $\underline{CH_3}$-CO), 23.6 (C-21)*, 24.2 (C-6)*, 26.3 (C-26), 26.6 (C-27), 29.3 (C-19), 41.9 (C-8), 43.4 (C-15), 48.8 (C-13), 49.5 (C-14), 51.0 (C-9), 51.4 (C-12), 54.5 (C-17), 73.8 (C-16), 78.0 (C-20), 79.2 (C-25), 118.3 (C-1), 119.7 (C-23), 130.7 (C-4), 133.1 (C-5), 136.6 (C-10), 140.1 (C-3)**, 141.2 (C-2)**, 152.2 (C-24), 167.3-170.0 (4 x CH_3-$\underline{C}$OO), 201.1 (C-22), 211.4 (C-11).

EI-MS: (70 eV, Finnigan 4000):
m/z (rel. Int.) = 608 (<1), 513 (1,6), 470 (1.0), 453 (0.8), 428 (3.8), 411 (3.6), 369 (1.1), 259 (;.4), 190 (12.6), 189 (10.5), 96 (100), 43 (72.3),

MS-Hochauflösung (VARIAN MAT 311):

$C_{35}H_{44}O_9$	gef. 608,29849	ber. 608,29853
$C_{29}H_{37}O_8$	gef. 513,24816	ber. 513,24884
$C_{25}H_{32}O_6$	gef. 428,22037	ber. 428,21989
$C_{25}H_{31}O_5$	gef. 411,21797	ber. 411,21715
$C_{15}H_{15}O_4$	gef. 259,09746	ber. 259,09703
$C_{16}H_{19}O_2$	gef. 259,13256	ber. 259,13342
$C_{12}H_{14}O_2$	gef. 190,09937	ber. 190,09938

Acetylierung von Fevicordin B (88) zur Verbindung 89

50 mg 88 wurden nach der Standardmethode acetyliert und chromatographisch gereinigt (5 g SiO_2, Säulendurchmesser 1 cm, Lm: CH-EE 7/3):
Man erhielt 37 mg 2,3,16-Tri-O-acetyl-fevicordin B (89) (74 % Ausbeute).
DC: Rf (KG, CH/EE 7/3) 0.30; Rf (KG, Tol/EE) 0.33;
Anisaldehyd: hellbraun
Beschreibung: weiße amorphe Substanz, die sich in Gegenwart von KG-Spuren und Methanol schnell gelblich färbt;

$[\alpha]_D^{21} = -34.6^{\circ}$ (c = 0.3 in $CHCl_3$);

UV: λ_{max} (log ε) = 278 nm (3,12); + OH^- = 324 (3.12), 298 nm (3.52);

IR (KBr): 3440 (OH), 1770 (C=O), 1720 (C=O), 1630 (Schulter, C=C), 1480 (C=C), 1370 cm^{-1} ($\underline{CH_3}$-C=O);

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.95 (s,3 H,CH_3-18), 1.05 (s,3 H,CH_3-30), 1.38 (s,3 H,CH_3-19), 1.40 (s,3 H,CH_3-21), 1.43 (s,3 H,CH_3-26), 1.45 (s,3 H,CH_3-27), 1.93 (s,3 H,CH_3-CO), 2.02 (s,3 H,CH_3-CO), 1.85-2.30 (m,ca. 5 H,H-7_A,H-8,H-15_B,H-24_A, H-24_B), 2.18 (s,3 H,CH_3-28), 2.27 (s,3 H, =C-OCO-CH_3), 2.32 (s,3 H, =C-OCO-CH_3), 2.55-2.95 (m,5 H,H-6_A,H-6_B, H-7_B, H-23_A, H-23_B), 2.65 (d,J=7 Hz,1 H,H-17), 2.78 (d,J=15 Hz,1 H, H-12_A), 2.92 (d,J=15 Hz, 1 H,H-12_B), 5.10 (bt,1 H, H-16), 6.70 (s,1 H, H-1)

^{13}C-NMR (C_6D_6, 22.5 MHz): δ = 12.5 (C-28), 19.2-21.9 (C-30,C-7, C-18, + 4 x $\underline{C}H_3$-CO), 24.3 (C-21)*, 24.4 (C-6)*, 25.8 (C-26), 26.2 (C-27), 29.2 (C-19), 30.8 (C-23), 35.3 (C-24), 42.0 (C-8), 43.4 (C-15),48.6 (C-13), 49.6 (C-14), 51.0 (C-9), 51.2 (C-12), 54.5 (C-17), 74.3 (C-16), 79.0 (C-20), 80.8 (C-25), 118.5 (C-1), 130.7 (C-4), 133.0 (C-5), 136.6 (C-10), 140.2 (C-3)**, 141.3 (C-2)**, 167.3-169.5 (4 x $CH_3-\underline{C}OO$), 211.6 (C-11)***, 212.5 (C-22)***

EI-MS (70 eV, Finnigan 4000):

m/z (rel. Int.) = 513 (60.1), 470 (23.5), 428 (63.9), 411 (91.5), 369 (26.1), 326 (23.8), 219 (40.6), 190 (86.1), 189 (70.8), 113 (100.0), 43 (72.5)

Methylierung von Fevicordin A (43) zur Verbindung 57:

100 mg 43, das durch enzymatische Spaltung von 20 gewonnen wurde, methylierte man nach der Standardmethode (N_2-Atmosphäre). Das Rohprodukt wurde chromatographisch gereinigt (10 g SiO_2, Säulendurchmesser 1 cm, Lm: Tol-EE 85/15): 60 mg 2,3-Di-O-methyl-fevicordin A (57).

DC: Rf (KG, Tol EE 75/25) 0.27; Rf (KG,CH-EE 7/3) 0.27;
Anisaldehyd: graubraun

Beschreibung: amorphes farbloses Produkt

$[\alpha]_D^{21} = -2.8^{\circ}$ (c = 0.9 in MeOH);

UV: λ_{max}(log ε) = 285 (3.44), 224 nm (4.14); + NaOH: keine Verschiebung

IR ($CHCl_3$): 1730 (C=O), 1690 (C=O), 1590 (C=C), 1450 (C=C), 1370 cm^{-1} ($\underline{C}H_3$-C=O)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 1.01 (s,3 H,CH_3-18), 1.04 (s,3 H,CH_3-30), 1.39 (s,3 H,CH_3-19), 1.42 (s,3 H,CH_3-21), 1.52 (s,3 H,CH_3-26), 1.54 (s,3 H,CH_3-27), 1.82-2.00 (m,2 H,H-7_A,H-15_B), 1.98 (s,3 H, CH_3-CO), 2.10 (s,3-4 H,CH_3-28,H-8), 2.18-2.32 (m,1 H,H-7_B), 2.45 (d,J=7 Hz,1 H,H-17), 2.58-2.68 (m,1 H,H-6_A), 2.73 (d,J=15 Hz,1H,H-12_A

2.73-2.83 (m,1 H,H-6_B), 2.90 (d,J=15 Hz,1 H, H-12_B), 3.75 (s,3 H,OCH_3), 3.78 (s,3 H,OCH_3), 4.30 (bt,1 H,H-16), 6.38 (d,J=16 Hz,1 H,H-23), 6.40 (s,1 H,H-1), 7.00 (d,J=16 Hz,1 H, H-24)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100.41 MHz): Tab. 18, S. 92

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100.41 MHz):

δ= 11.6 (C-28), 19.2 (C-30), 19.8 (C-7), 20.0 (C-18), 22.0 ($\underline{C}H_3$-CO), 24.0 (C-6), 24.2 (C-21), 25.8 (C-26), 26.6 (C-27), 29.3 (C-19), 42.2 (C-8), 45.5 (C-15), 49.2 (C-14), 50.8 (C-13), 50.8 (C-12), 51.2 (C-9), 55.8 (OCH_3/C-2), 58.3 (C-17), 60.4 (OCH_3/C-3), 71.3 (C-16), 78.2 (C-20), 79.6 (C-25), 107.1 (C-1), 120.8 (C-23), 127.1 (C-5) 130.8 (C-4), 133.3 (C-10), 145.8 (C-3),150.4 (C-2), 152.1 (C-24), 170.1 (CH_3-$\underline{C}$OO), 202.5 (C-22), 214.2 (C-11)

$^{13}C\{^{1}H\}$-Shift korreliertes 2 D-Spektrum (long range) ($CDCl_3$,GX 400): Abb. 15, S. 94, Tab. 19, S. 93.

Pulsfolge: 90^{o}_{H}-t-180^{o}_{C}-t-t_1-90^{o}_{H}/90^{o}_{C}-t_1-Aufnahme$_C$/Breitbandentkopp. ($t_1=2\frac{1}{J}$)

EI-MS (70 eV): Finnigan 4500:

m/z (rel. Int.) = 570 (7.4), 510 (1.2), 414 (39.1), 245 (8.6), 218 (27.7), 217 (22.9), 203 (8.9), 111 (19), 96 (100), 43 (37.1)

Methylierung und katalytische Hydrierung von Fraktion C-1.2 zur Verbindung 90

80 mg Fraktion C-1.2 (siehe Chromatograhie Nr. 47), bestehend aus Fevicordin A und Fevicordin B wurden nach der Standardmethode methyliert (N_2-Atmosphäre). Das Gemisch der 2 Methylierungsprodukte wurde einer Hydrierung am 10 %-igen Pd/A-Kohle-Katalysator unterworfen. Nach Abfiltrieren und chromatographischer Reinigung (8 g SiO_2, Säulendurchmesser 1 cm, TOL-EE 75/25) wurden 43 mg 2,3-Di-O-methyl-fevicordin B (90) erhalten (53.7 % Ausbeute).

DC: Rf (KG, Tol EE 75/25) 0.30; Rf (KG, CH-EE 7/3) 0.30;
Anisaldehyd: hellbraun

Bescheibung: amorphes farbloses Produkt

$[\alpha]_D^{21} = -4.0^\circ$ (c = 0.5 in Methanol)

UV: λ_{max} (log ε) = 285 nm (3.43); + NaOH: Keine Verschiebung

IR ($CHCl_3$): 1720 (C=O), 1600 (C=C), 1460 (C=C), 1370 ($\underline{CH_3}$-C=O);

^{1}H-NMR (C_6D_6, 400 MHz): δ = 0.92 (s,3 H), 1.10 (s,3 H), 1.13 (s,3 H), 1.30 (s,3 H), 1.40 (s,3 H), 1.55 (s,3 H), 1.65 (s,3 H), 1.90-2.40 (m,ca. 9 H), 2.12 (s,3 H,CH_3-28), 2.50-2.60 (m,1 H), 2.70 (d,J=15 Hz,1 H, H-12$_A$), 2.80 (d,J=15 Hz, 1 H, H-12$_B$), 2.78-2.83 (m,1 H), 3.50 (s, 3 H,OCH_3), 3.72 (s,3 H, OCH_3), 3.90 (bt, 1 H, H-16), 4.53 (s,1 H, OH-), 6.82 (s,1 H, H-1)

^{13}C-NMR (C_6D_6, 22.5 MHz)δ = 11.9 (C-28), 19.7 (C-30), 19.7 (C-7), 20.1 (C-18), 22.0 ($\underline{CH_3}$-CO). 24.2 (C-6)*, 24.7 (C-21)*, 26.1 (C-26), 26.2 (C-27), 29.4 (C-19), 31.0 (C-23), 34.9 (C-24), 42.8 (C-8), 45.7 (C-15), 49.3 (C-14), 50.5 (C-13), 51.3 (C-12), 51.5 (C-9), 55.6 (OCH_3/C-2), 58.2 (C-17), 60.0 (OCH_3/C-3), 71.1 (C-16), 79.4 (C-20), 81.1 (C-25), 108.3 (C-1), 127.4 (C-5), 130.5 (C-4), 133.6 (C-10), 146.8 (C-3), 151.4 (C-2), 169.8 (CH_3-$\underline{C}$OO), 212.9 (C-11)**, 213.6 (C-22)**

EI-MS (70 eV, Finnigan 4500):
m/z (rel. Int.) = 572 (15.8), 512 (15.1), 414 (100), 397 (13.2), 245 (28.3), 218 (54.1), 217 (43.6), 205 (37.1), 203 (21.9), 113 (76.1), 43 (82.9),

Herstellung von Fevicordin A-formaldehydacetal (63) aus 43

200 mg Fevicordin A (43) wurden 2 Tage über Magnesiumperchlorat im Vakuum getrocknet, in einen 2-Halskolben gegeben, der vorher 1 Stunde im Trockenschrank aufbewahrt wurde, und in 10 ml zweimal absolutiertem DMF gelöst. Der Ansatz wurde mit 150 mg (ca. 5-molarer Überschuß) CsF versetzt und mit einem Trockenrohr und Thermometer versehen.

Die Trocknung des CSF erfolgte 2 Tage lang bei 350°C im Platintiegel, worauf es fein gepulvert und anschließend nochmals eine Stunde bei 350°C erhitzt wurde.

Dann kühlte man die Mischung auf 10° C und gab anschließend 15 Tropfen CH_2Br_2 (über $CaCl_2$ frisch destilliert) zu. Den Ansatz rührte man unter ständigem leichten Stickstoffstrom bei max 30° C. Nach 6 Stunden wurden erneut 15 Tropfen CH_2Br_2 zugegeben und weitere 12 Stunden gerührt. Die Aufarbeitung des Ansatzes erfolgte nach Verdünnen mit 10 ml H_2O durch mehrfaches Ausschütteln mit je 5 ml CCl_4. Nach Trocknen der organischen Phasen über Na_2SO_4 wurde einrotiert und das Reaktionsgemisch chromatographisch gereinigt (20 g SiO_2, Durchmesser der Säule 2,5 cm, Lm: Tol-EE 8/2): 50 mg 63 (25 % Ausbeute)

DC: Rf (KG, Tol/EE 75/25) 0.30; Rf (KG, CH/EE 7/3) 0.29;
Anisaldehyd: graubraun

Schmelzpunkt: 201-204° C (Aceton/Cyclohexan)

$[\alpha]_D^{21}$ = + 9.5° (0.3 in $CHCl_3$);

UV: λ_{max} (log ε) = 285 (3.51); 225 nm (4.14); + NaOH: keine Verschiebung

IR: ($CHCl_3$): 3600 (OH), 2780 (O-CH_2-O), 1720 (C=O), 1690 (C=O), 1630, 1460 (C=C), 1370 cm^{-1} ($\underline{CH_3}$-CO);

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 1.01 (s,3 H,CH_3-18), 1.03 (s,3 H,CH_3-30), 1.36 (s,3 H,CH_3-19), 1.42 (s,3 H,CH_3-21), 1.52 (s,3 H,CH_3-26), 1.55 (s,3 H,CH_3-27), 1.82-2.05 (m,2 H,H-7_A,H-15_B), 1.98 (s,3 H, CH_3-CO), 2.10 (s,3-4 H,CH_3-28, H-8),

2.13-2.32 (m,1 H,H-7_B), 2.43 (d,J=7 Hz, 1 H,H-17), 2.55-2.65 (m,1 H,H-6_A), 2.72 (d,J=15 Hz,1 H,H-12_A), 2.73-2.83 (m,1 H, H-6_B), 2.90 (d,J=15 Hz,1 H,H-12_B), 4.30 (bt,1 H, H-16), 5.88 (d,J=1,4 Hz,2 H, -OCH_2O-), 6.40 (s+d,J=16 Hz,2 H,H-1, H-23), 7.00 (d,J=16 Hz,1 H,H-24)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 22.5 MHz)δ= 11.5 (C-28), 19.2 (C-30)*, 19.5 (C-7)*, 20.0 (C-18), 21.8 ($\underline{C}H_3$-CO), 23.4 (C-6)**, 23.8 (C-21)**25.9 (C-26), 26.3 (C-27), 28.6 (C-19), 42.4 (C-8), 45.2 (C-15), 49.4 (C-14), 50.8 (C-13), 50.9 (C-12), 51.2 (C-9), 58.4 (C-17), 71.2 (C-16), 78.3 (C-20), 79.2 (C-25), 100.3 (-OCH_2O-) 104.0 (C-1), 117.7 (C-4), 120.4 (C-23), 128.0 (C-5), 131.0 (C-10), 144.9 (C-3)***, 146,1 (C-2)***, 151.6 (C-24), 170.0 (CH_3-$\underline{C}OO$), 202.4 (C-22), 213.7 (C-11)

EI-MS (70 eV, Finnigan 4500):
m/z (rel. Int.) = 554 (7.4), 494 (1.4), 398 (100), 202 (63), 201 (44.4), 96 (84.1)

Herstellung von Fevicordin B-formaldehydacetal (91) aus 88

Analog der Herstellung von Fevicordin A-formaldehydacetal (63) wurden 25 mg Fevicordin B (88) mittels CH_2Br_2 in absolutem DMF mit CsF-Überschuß in die Verbindung 91 überführt. Man erhielt nach Aufarbeitung und Reinigung 5 mg gewünschtes Produkt. Die Verbindung war identisch mit dem durch Hydrierung von 25 mg 63 am Pd/A-Kohle-Kontakt gewonnenen Produkt (20 mg).

DC: Rf (KG,Tol-EE 75/25) 0.32; Rf (KG, CH-EE 7/3) 0.30
Anisaldehyd: hellbraun
Beschreibung: weißes, amorphes Pulver

$[\alpha]_D^{21} = +13.2^{\circ}$ (c = 0.3 in $CHCl_3$);

UV: λ_{max} (log ε) = 285 nm (3.50); + NaOH: keine Verschiebung

IR: ($CHCl_3$): 2780 (O-CH_2-O), 1720 (C=O), 1600 (C=C), 1460 (C=C), 1370 cm^{-1} ($\underline{CH_3}$-C=O)

^{1}H-NMR: (C_6D_6, 400 MHz): δ = 0.90 (s,3 H), 1.08 (s,3 H), 1.12 (s,3 H), 1.35 (s,3 H), 1.40 (s,3 H), 1.52 (s,3 H), 1.68 (s,3 H), 1.80-2.40 (m, ca. 9 H), 2.00 (s,3 H), 2.40-2.50 (m,1 H), 2.52 (d,J=15 Hz,1 H,H-12_A), 2.68 (d,J=15 Hz, 1 H,H-12_B), 2.77-2.85 (m,1 H), 3.92 (bt, 1 H,H-16), 4.50 (s,1 H,OH-), [5.34 (d, J=1.3 Hz,1 H), 5.40 (d,J=1.3 Hz,1 H)-OCH_2O-], 6.86 (s,1 H)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 22.5 MHz): δ= 11.5 (C-28), 19.3 (C-30)*, 19.5 (C-7)*, 19.6 (C-18), 22.3 ($\underline{CH_3}$-CO), 23.5 (C-6), 24.4 (C-21), 25.8 (C-26), 26.9 (C-27), 28.6 (C-19), 30.7 (C-23), 34.9 (C-24), 42.5 (C-8), 45.5 (C-15), 49.1 (C-14), 50.4 (C-13), 51.1 (C-12), 51.4 (C-9), 57.9 (C-17), 71.1 (C-16), 79.1 (C-20), 81.2 (C-25), 100.4 (-OCH_2O-), 103.3 (C-1), 117.6 (C-4), 127.9 (C-5), 131.0 (C-10), 144.6 (C-3)**, 145.0 (C-2)**, 170.1 (CH_3-$\underline{C}$OO), 213.6 (C-11)***, 213.9 (C-22)***

EI-MS (70 eV, Finnigan 4500):

m/z (rel. Int.) = 556 (9.7), 496 (2.3), 398 (100), 202 (40.1), 201 (37.7), 43 (72)

6,7-Dehydro-fevicordin A-2,3-dion (44) durch Oxidation von 43

50 mg Fevicordin A (43) und 85 mg DDQ (ca. 4-molarer Überschuß) wurden in je 10 ml Diethylether gelöst und 30 Minuten im Eisbad gekühlt ($0^{\circ}C$). Dann wurde die DDQ-Lösung unter Rühren in die Aglucon-Lösung getropft und die Mischung bei 0° C noch 12 Stunden gerührt. Der Reaktionsansatz wurde im Vakuum unter Lichtschutz im kalten Wasserbad zur Trockene gebracht und chromatographisch gereinigt (SiO_2, 10 g, Lm: CH-EE 50/50, Säulendurchmesser: 1 cm) 20 mg 44 (40 %)

DC: Rf (KG, CH-EE 1/1) 0.25; Rf (KG, C-M 98/2) 0.44;
gelbe Eigenfarbe auf KG, die nach kurzer Zeit wieder verblaßt

Beschreibung: dunkelgelbe amorphe Substanz, die sich bei Lichteinfluß und Raumtemperatur allmählich zersetzt.

$[\alpha]_D^{21} = -433^{\circ}$ (c = 0.05 in MeOH);

$UV\lambda_{max}$ (log ε) = 450 (3.14), 340 (3.47), 238 (4.15)

IR: ($CHCl_3$): 1720 (C=O), 1685 (C=O), 1650 (C=C), 1620 (C=C), 1370 ($\underline{CH_3}$-C=O)

^{1}H-NMR (C_6D_6, 250 MHz): Siehe Abb. 10, S. 75

^{1}H-NMR (C_6D_6, 250 MHz): δ = 0.89 (s,3 H), 0.94 (s,3 H), 1.16 (s,3 H), 1.23 (s,3 H), 1.32 (s,3 H), 1.35 (s,3 H), 1.56 (CH_3-CO), 1.74 (s,3 H,CH_3-28), 2.15 (d,J=8 Hz,1 H, H-8), 2.31 (d,J=7 Hz, 1 H, H-17), 2.38 (d,J=15 Hz,1 H,H-12_A), 2.57 (bd,J=15 Hz,1 H, H-12_B), 4.19 (bt,1 H,H-16), 4.43 (s,1 H,OH-), 5.55 (dd,J_1=11,J_2=8 Hz, 1 H, H-7), 6.09 (s,1 H, H-1), 6.19 (d,J=11 Hz, 1 H, H-6), 6.52 (d,J=16 Hz,1 H, H-23), 7.19 (d,J=16 Hz,1 H, H-24)

^{13}C-NMR (C_6D_6, 22.5 MHz): Abb. 11, S. 79

^{13}C-NMR [off-resonance-Spektrum (C_6D_6, 22.5 MHz)]:

δ = 10.7 (C-28), 19.3 (C-30), 20.2 (C-18), 21.5 ($\underline{C}H_3$-CO), 24.1 (C-21), 26.2 (C-26), 26.2 (C-27), 27.2 (C-19), 44.2 (C-15), 49.2 (C-14), 49.9 (C-8/d), 50.5 (C-13), 50.7 (C-12), 52.0 (C-9), 58.8 (C-17), 71.6 (C-16), 78.5 (C-20), 79.2 (C-25), 121.3 (C-23), 123.0 (d), 125.1 (d), 132.1 (s), 136.3 (s), 138.4 (d), 151.6 (C-24), 155.0 (s), 169.8 (CH_3-$\underline{C}$OO), 179.9 (C-2)*, 180.4 (C-3)*, 202.3 (C-22), 208.3 (C-11)

EI-MS (70 eV, Finnigan 4500):

m/z (rel. Int.) = 480 (6.3), 384 (11.7), 189 (20.6), 188 (79.7), 111 (22.1), 96 (62.3), 43 (100)

DCI-MS (NH_3, Finnigan 4500):

m/z (rel. Int.) = 558 [(38.5), M + NH_4 + 2 $^+$]
498 [(10.6), M + NH_4 + 2 - Essigsäure],
174 (100)

Umsetzung von 6,7-Dehydro-fevicordin A-2,3-dion (44) mit Ascorbinsäure zur Verbindung 51

15 mg 44 (durch Oxidation von 43 mit DDQ gewonnen) wurden in 2 ml Methanol gelöst und mit 5 mg Ascorbinsäure in 2 ml Methanol versetzt (ca. 1-molarer Umsatz). Der Reaktionsansatz entfärbte sich innerhalb weniger Sekunden von dunkelgelbem zu schwach hellgelbem Aussehen. Dann wurde unter Lichtschutz und N_2 i. Vak. eingeengt und chromatographisch gereinigt (3 g SiO_2, 1 cm Säulendurchmesser, LM: CH-EE 6/4). Die Aufarbeitung erfolgte ebenfalls unter Lichtschutz und N_2. Man erhielt 10 mg einheitliches 6,7-Dehydro-fevicordin A (51).

DC: Rf (KG,C-M 98/2) 0.30; Rf (KG, CH-EE 6/4) 0.37;
Anisaldehyd: graubraun

Beschreibung: weiße amorphe Substanz, die sich an der Luft und in Lösung schnell gelb färbt.

$[\alpha]_D^{21}$ = -67.3 (0.5 in MeOH)

UV: λ_{max} (log ε) = 317 (3.18), 305 (3.33), 290 (3.48), 234 (4.15);
+ NaOH: Verschiebung nach 380 (3.18), 350 (3.26);
336 (3,36), 243 nm (4.00)

IR: ($CHCl_3$) = 3040 (OH), 1730 (C=O), 1685 (C=O), 1630 (C=C),
1610 (C=C), 1450 (C=C), 1370 ($\underline{CH_3}$-CO)

^{1}H-NMR (C_6D_6, 400 MHz): δ = 1.10 (s,3 H), 1.12 (s,3 H), 1.27 (s,3 H),
1.34 (s,3 H), 1.36 (s,3 H), 1.46 (s,3-4 H),
1.60 (s,3 H), 1.70-1.82 (m,1 H), 2.26
(s,3 H,CH_3-28), 2.31 (d,J=8 Hz,1 H,H-8),
2.37 (d,J=7 Hz,1 H,H-17), 2.80 (d,J=15 Hz,
1 H, H-12_A),2.85 (d,J=15 Hz,1 H,H-12_B),
4.27 (bt,1 H,H-16), 4.54 (s,1 H,OH), 5.34
(dd,J_1=11,J_2=8 Hz,1 H,H-7), 5.76 (bs,1 H,OH),
6.48 (d,J=16 Hz,1 H,H-23), 6.57 (s,1 H,H-1)
6.70 (d,J=11 Hz,1 H, H-6), 7.22 (d,J=16 Hz,
1 H, H-24)

^{13}C-NMR (C_6D_6, 22.5 MHz):δ= 11.2 (C-28), 17.9 (C-30), 20.2 (C-18),
21.4 ($\underline{CH_3}$-CO), 24.1 (C-21), 26.2 (C-26),
26.3 (C-27), 30.1 (C-19), 43.8 (C-8), 46.8
(C-15), 48.3 (C-14), 49.6 (C-13), 51.2 (C-9),
51.4 (C-12), 58.8 (C-17), 71.7 (C-16), 78.4
(C-20), 79.2 (C-25), 109.7 (C-1), 121.2 (C-6)*,
122.0 (C-23), 124.8 (C-4), 125.5 (C-7)*, 128.6
(C-10)**, 128.9 (C-5)**, 142.6 (C-2)***, 143.0 (C-3)***,
151.4 (C-24), 169.4 (CH_3-$\underline{CO}$O), 202.5 (C-22),
215.0 (C-11)

Oxidativer Abbau der Seitenkette von Fevicordin A (43) zur Verbindung 68

180 mg Fevicordin A (durch enzymatische Spaltung mit Cellulase aus 20 gewonnen) wurden wie bei 57 beschrieben methyliert und isoliert: 110 mg (61 % Ausbeute). Anschließend acetylierte man nach der Standard-Methode und erhielt 90 mg (Acetylierungsprodukt), das ohne weitere

Zwischenreinigung zur nachfolgenden oxidativen Spaltung eingesetzt wurde.

Dazu löste man in 5 ml Methanol und versetzte portionsweise mit 30 mg $NaBH_4$ (ca. 5-molarer Überschuß). Nach Beendigung der H_2-Entwicklung wurde 12 Stunden gerührt. Dann verdünnte man mit 5 ml H_2O und schüttelte 5 x mit je 5 ml $CHCl_3$ aus. Die vereinigten organischen Phasen wurden 2 x mit H_2O gewaschen und i. Vak. eingeengt. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen zeigten, daß zwei Hauptprodukte von annähernd gleicher Polarität entstanden waren (=diastereomere 22-ole): Rf (KG-DC, Tol-EE 75/25): = 0.29, (Vergleich, Rf Ausgangsverbindung vor Reduktion mit $NaBH_4$: 0.34); die Rf-Werte von außerdem entstandenen Nebenprodukten lagen im Bereich 0.18-0.08. Sie konnten bei der anschließenden Chromatographie (10 g SiO_2, Säulendurchmesser 1 cm, LM: Tol-EE 75/25) leicht abgetrennt werden. Die beiden diastereomeren Hauptprodukte wurden zusammen eluiert und weiter verarbeitet (68 mg, 75,5 % Ausbeute) Man löste das Gemisch in 50 ml Methanol-H_2O 5/1, versetzte mit 95 mg $NaJO_4$ (ca. 4-molarer Überschuß) und rührte 48 Stunden bei Raumtemperatur. Der Ansatz wurde anschließend mit 50 ml H_2O verdünnt und 5 x mit je 50 ml $CHCl_3$ ausgeschüttelt. Die $CHCl_3$-Phasen wusch man 2 x mit 100 ml H_2O; dann wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel i.Vak. abdestilliert. Man erhielt 50 mg Reaktionsgemisch, das anschließend über SiO_2 (5 g, 1cm Ø , Tol-EE 8/2) chromatographiert wurde: 30 mg (68) (44 % Ausbeute).

DC: Rf (KG, Tol-EE 8/2) 0.33; Rf (KG,CH-EE 7/3), 0.30;
Anisaldehyd: nach Erhitzen kurzzeitig hellgelb, schnell verblaßend

Beschreibung: farbloses, amorphes Pulver

$[\alpha]_D^{21} = +\ 42.6^{\circ}$ (c = 0.5 in $CHCl_3$)

UV: λ_{max} (log ε) = 286 (3.47); + NaOH: Keine Verschiebung

IR (KBr): 1730 (C=O), 1700 (C=O), 1600 (C=C), 1480 (C=C), 1370 (CH_3-C=O);

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.70 (s,3 H,CH_3-18), 1.02 (s,3 H,CH_3/C-14), 1.39 (s,3 H,CH_3/C-9), 1.60 (d,J=15 Hz,1 H, H-15_A), 1.80-1.95 (m,2 H,H-7_A,H-15_B), 1.98

(s,3 H,CH_3-CO), 2.10 (s,3 H,CH_3-21), 2.11 (s,3-4 H,CH_3/C-4 +H-8), 2.20-2.30 (m,1 H,H-7_B), 2.55 (d,J=15 Hz,1 H,H-12_A), 2.55-2.65 (m,1 H,H-6_A), 2.70-2.80 (m,1 H, H-6_B), 2.92 (d,J=15 Hz,1 H,H-12_B), 3.20 (d,J=7 Hz,1 H,H-17), 3.74 (s,3 H,OCH_3), 3.75 (s,3 H,OCH_3), 5.60 (bt,1 H, H-16), 6.37 (s,1 H,H-1)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 22.5 MHz):δ= 11.7 ($\underline{C}H_3$/C_4), 19.3 (CH_3/C-14), 19.5 (C-7)*, 19.7 (C-18)*, 21.1 ($\underline{C}H_3$-CO), 23.7 (C-6), 28.8 ($\underline{C}H_3$/C-9), 31.2 (C-21), 42.6 (C-8), 43.5 (C-15), 49.0 (C-9), 49.2 (C-12), 49.2 (C-14), 51.3 (C-13), 55.6 (OCH_3/C-2), 60.3 (OCH_3/C-3), 64.0 (C-17), 74.7 (C-16), 106.8 (C-1), 126.7 (C-5), 130.5 (C-4), 132.5 (C-10), 145.8 (C-3), 150.6 (C-2), 170.5 (CH_3-$\underline{C}$OO), 206.0 (C-20), 212.5 (C-11)

EI-MS (70 eV, Finnigan 4500):
m/z (rel. Int.) = 456 (100), 245 (21.7), 218 (89), 217 (74.6), 203 (25.2), 43 (72.1)

Oxidativer Abbau von Fevicordin-A-2-O-β-D-glucosid (20) zur Verbindung 70

200 mg 20 wurden wie bei 56 beschrieben methyliert und gereinigt. Man erhielt 140 mg 56 (70 % Ausbeute), das zur nachfolgenden oxidativen Spaltung eingesetzt wurde. Wie bei 68 beschrieben, wurde 56 mit einem 5-molaren Überschuß $NaBH_4$ (40 mg) zu den diastereomeren 20,22-Diol-Verbindungen reduziert, die chromatographisch gereinigt und gemeinsam eluiert wurden (15 g SiO_2, 1 cm Ø, Lm: M 9/1): 109 mg (78 % Ausbeute).

Anschließend rührte man das Gemisch der diastereomeren Diole mit einem 10-molaren Überschuß $NaJO_4$ (325 mg) in 50 ml Methanol-Wasser 5/1 48 Stunden lang bei Raumtemperatur. Nach Aufarbeitung (siehe

Beschreibung bei 68) wurde chromatographisch das Hauptprodukt isoliert (10 g SiO_2, 1 cm Ø, Lm: C-M 95/5): 54 mg (49 %), das dann einer 2-stündigen Essigsäurehydrolyse (50 %-ige Essigsäure, 2 Tropfen HCL konzentriert) unter Rückflußkochen unterworfen wurde. Das Reaktionsgemisch brachte man mit 10 %-iger K_2CO_3-Lösung auf pH 5 und schüttelte dann mehrmals mit $CHCl_3$ aus; die vereinigten $CHCl_3$-Phasen wurden 1 x mit 5 %-iger K_2CO_3-Lösung und dann mit H_2O bis zur neutralen Reaktion gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 engte man i. Vak. ein und isolierte über SiO_2 (5 g, Tol-EE 8/2) 36 mg 70 (66 %).

DC: Rf (KG, Tol-EE 8/2) 0.30; Rf (KG,CH-EE 7/3 0.26,
Anisaldehyd: nach Erhitzen kurzzeitig hellgelb, schnell verblassend

Schmelzpunkt: 210-212°C, kleine Kristalle aus Methanol

$[\alpha]_D^{21}$ = + 161.2° (c = 0.6 in $CHCl_3$);

UV: λ_{max} (log ε) = 286 (3.46), 238 (4.11); + OH^- = 295 (3.58), 238 nm (4.19);

IR: (KBr): 1690 (C=O), 1660 (C=O), 1600 (C=C), 1500 (C=C), 1380 ($\underline{CH}_3$-C=O), 870 (HC) cm^{-1}

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.94 (s,3 H,CH_3-18), 1.00 (s,3 H, CH_3/C-14), 1.45 (s,3 H,CH_3/C-9), 1.92 -2.00 (m,1 H,H-7_A), 2.13 (3-4 H,CH_3/C-4, H-8), 2.26 (s,3 H,CH_3-21), 2.26-2.45 (m, 3 H,H-7_B,H-15_A,H-15_B), 2.58-2.70 (m,2 H, H-6_A, H-6_B), 2.72 (d,J=15 Hz,1 H,H-12_A), 3.12 (d,J=15 Hz,1 H,H-12_B), 3.72 (s,3 H, OCH_3), 6.62 (s,1 H,H-1), 6.70 (dd,J_1=4, J_2=2.5 Hz,1 H,H-16)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 22.5 MHz): Tab. 21, S. 108

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 22.5 MHz): δ= 12.0 ($\underline{C}H_3$/C-4), 20.2 ($\underline{C}H_3$/C-14)*, 20.3 (C-7)*, 22.6 (C-18), 24.0 (C-6), 26.8 (C-21), 30.0 ($\underline{C}H_3$/C-9), 41.4 (C-15),

42.4 (C-8), 46.6 (C-12), 49.8 (C-14), 51.7 (C-9), 52.6 (C-13), 60.7 (OCH_3), 110.6 (C-1), 126.3 (C-5), 129.3 (C-4), 135.0 (C-10), 143.4 (C-16), 144.0 (C-3), 146.5 (C-2), 151.4 (C-17), 196.0 (C-20), 213.4 (C-11)

EI-MS (70 eV, Finnigan 4500)
m/z (rel. Int.) = 382 (28.3), 231 (3.1), 204 (46.4), 203 (100), 189 (23), 177 (62.8)

Acetylierung von 70 zur Verbindung 2-Acetoxy-3-methoxy-4,9,14-trimethyl-19,29-bisnorpregna -1,3,5 (10),16-tetraen-11,20-dion (71)

17 mg (70) wurden nach der Standardmethode acetyliert und chromatographisch gereinigt (3 g SiO_2, 1 cm Säulendurchmesser, Lm: Tol-EE 8/2): 15 mg 71 (88 %).

DC: Rf (KG,Tol-EE 8/2) 0.37; Rf (KG,CH-EE 7/3) 0.28
Anisaldehyd: nach Erhitzen kurzzeitig hellgelb, schnell verblassend

Schmelzpunkt: 185-187° C (Methanol)

$[\alpha]_D^{21}$ = + 115.4° (c = 0.8 in $CHCl_3$);

UV: λ_{max} (log ε) = 280 (3.08), 236 (4.11), + NaOH: Verschiebung nach 295 (3.52), 236 nm (4.21);

IR: (KBr): 1760 (C=O), 1690 (C=O), 1660 (C=O), 1600 (C=C), 1480 (C=C), 1370 cm^{-1} ($\underline{CH_3}$-C=O)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): siehe Abb. 21, S. 106

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.95 (s,3 H,CH_3-18), 1.00 (s,3 H,CH_3/C-14), 1.46 (s,3 H,CH_3/C-9), 1.97-2.02 (m,1 H,H-7_A), 2.13 (3-4 H,CH_3/C-4,H-8), 2.28 (s,3 H, CH_3-21), 2.30 (s,3 H,=C-OCO-CH_3), 2.30 -2.43 (m,3 H, H-7_B,H-15_A,H-15_B), 2.62-2.80 (m,2 H,H-6_A,H-6_B), 2.72 (d,J=15 Hz, 1 H,H-12_A), 3.15 (d,J=15 Hz,1 H,H-12_B),

3.72 (s,3 H,OCH_3), 6.70 (dd,J_1=4,J_2=2.5 Hz,1 H,H-16), 6.74 (s,1 H,H-1)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 22.5 MHz): Tab. 21, S. 108

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 22.5 MHz): δ = 12.0 ($\underline{C}H_3$/C-4), 20.2 ($\underline{C}H_3$/C-14), 20.4 (C-7), 20.6 ($\underline{C}H_3$-CO), 22.6 (C-18), 24.5 (C-6), 26.8 (C-21), 30.2 ($\underline{C}H_3$/C-9), 41.3 (C-15), 42.4 (C-8), 46.7 (C-12), 49.8 (C-14), 51.5 (C-9), 52.6 (C-13), 60.6 ($O\underline{C}H_3$), 118.2 (C-1), 130.8 (C-4), 133.0 (C-5), 134.5 (C-10), 141.6 (C-2), 143.2 (C-16), 148.2 (C-3), 151.3 (C-17), 168.8 (CH_3-$\underline{C}OO$), 195.5 (C-20), 213.4 (C-11)

EI-MS (70 eV, Finnigan 4500):
m/z (rel. Int.) = 424 (9.3), 382 (7.0), 204 (46.1), 203 (77.6), 177 (100)

3.2.8 Synthesen

Synthese von 2,3-Dimethoxy-tetralin (59) aus 58

206 mg (1 mmol) 6,7-Dimethoxy-tetralon-(2) (58) (Fa. Aldrich) wurden in 10 ml eines Gemisches von DMF/Sulfolan 1/1, das 25 mg p-Toluolsulfonsäure enthielt, gelöst. Dann versetzte man mit 230 mg (1,25 mmol) p-Toluolsulfonsäurehydrazid und gab portionsweise 250 mg (4 mmol) $NaBH_3$/CN zu. Die Mischung wurde anschließend 3 Stunden unter Rückflußkühlung bei 100° C gerührt. Den Ansatz verdünnte man dann mit 10 ml H_2O, extrahierte 5 x mit je 10 ml Cyclohexan und engte i. Vak. ein. Die Auftrennung des Reaktionsgemisches erfolgte auf chromatographischem Weg (30 g SiO_2, 2.5 cm Säulendurchmesser, LM: CH-EE 9/1); 66 mg 59 (32 % Ausbeute).

DC: Rf: (KG, Tol) 0.32; Rf (KG,CH-EE 95/5) 0.34
Anisaldehyd: helles Türkisblau
Schmelzpunkt: 57°C; feine Nadeln aus Methanol bei 4°C

UV: λ_{max} (log ε) = 289 (3.54), 284 nm (3.54); + NaOH: keine Verschiebung

IR (KBr): 1600 (C=C), 1510 (C=C), 860 cm^{-1} (H-C)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 90 MHz): δ = 1.77 (qui.,4 H,H-6_A,H-6_B,H-7_A,H-7_B), 2.69 (bt,4 H,H-5_A,H-5_B,H-8_A,H-8_B), 3.83 (s,6 H,OCH_3), 6.56 (s,2 H,H-1,H-4)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 22.5 MHz): δ = 23.1 (C-6,C-7), 28.7 (C-5, C-8), 55.7 (2 x OCH_3), 112.2 (C-1,C-4), 128.7 (C-8a,C-4a), 147.0 (C-2,C-3)

EI-MS (70 eV, Finnigan 4500):

m/z (rel. Int.) = 192 (100), 177 (27.8), 161 (29.9), 149 (14.9), 107 (32.3), 91 (21.1), 77 (12.2)

Synthese von 1-Chlormethyl-2,3-dimethoxy-tetralin (60) aus 59

66 mg 59 wurden in 5 ml Eisessig gelöst und mit 5 Tropfen Chlormethylmethylether versetzt. Man ließ die Mischung 1 Stunde unter Rückflußkühlung kochen und gab nochmals 5 Tropfen Chlormethylmethylether zu. erhitzte weitere 2 Stunden zum Sieden und brach dann die Reaktion ab. Der Ansatz wurde mit 5 ml H_2O verdünnt und mehrmals mit $CHCl_3$ extrahiert. Die vereinigten $CHCl_3$-Phasen wurden 1 x mit 5 %-iger K_2CO_3-Lösung und dann mit H_2O gewaschen bis zur neutralen Reaktion und das $CHCl_3$ nach dem Trocknen über Na_2SO_4 i. Vak. eingeengt. Die Reinigung erfolgte chromatographisch (7 g SiO_2, 1 cm Ø, Lm: Toluol): 30 mg 60 (45 % Ausbeute)

DC: Rf (KG, Tol) 0.62, Rf (KG,CH-EE 98/2) 0.33
Anisaldehyd: helles türkisblau

Schmelzpunkt: 66° C, feine Nadeln aus Methanol

UV: λ_{max} (log ε) = 294 (3.41), + NaOH: keine Verschiebung

IR: (KBr): 1600 (C=C), 1490 (C=C), 1430 (CH_2-Cl), 860 cm^{-1} (H-C)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 90 MHz): δ = 1.79 (quin., 4 H,H-6_A,H-6_B,H-7_A,H-7_B), 2.71 (bt,4 H,H-5_A,H-5_B,H-8_A,H-8_B), 3.82 (s,3 H,OCH_3), 3.89 (s,3 H,OCH_3), 4.71 (s, 2 H,CH_2-Cl), 6.62 (s,1 H,H-4)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 22.5 MHz): δ = 22.9 (C-6*, 23.0 (C-7*, 25.1 (C-8), 30.1 (C-5), 37.8 (CH_2-Cl), 55.9 (OCH_3/C-3) 61.4 (OCH_3/C-2), 114.1 (C-4), 128.7 (C-8a), 129.7 (C-1), 133.3 (C-4a), 146.1 (C-2), 150.4 (C-3)

EI-MS (70 eV, Finnigan 4500):

m/z (rel. Int.) = 242 (34.1), 240 (100), 227 (3.0), 225 (10.0), 205 (30.8), 190 (70.4), 175 (8.4), 161 (31.9), 91 (32.6), 77 (14.7)

Synthese von 2,3-Dimethoxy-1-methyl-tetralin (61) aus 60

30 mg 60 löste man in 5 ml Benzol und verdrängte den Sauerstoff über der Lösungsoberfläche durch gründliches Durchblasen von Stickstoff. 0.1 ml Tributyl-Zinnhydrid wurden mit Hilfe einer Spritze zugegeben. Dem Rückflußkühler wurde ein mit N_2 gefüllter Luftballon aufgesetzt. Dann erhitzte man den Ansatz 2 Stunden lang zum Sieden. Nach Beendigung der Reaktion (DC-Kontrolle) gab man 10 ml H_2O und 2 Tropfen 2 N-HCL zu und schüttelte mehrmals mit Benzol aus. Nach Trocknen der organischen Phase über Na_2SO_4 wurde einrotiert und chromatographisch an SiO_2 gereinigt (4 g, CH-EE 98/2). Man erhielt 18 mg des gewünschten Produkts.

DC: Rf (KG,Tol) 0.50; Rf (KG,CH-EE 98/2) 0.30;
Anisaldehyd: violett

Schmelzpunkt: 31°C, kleine Kristalle aus Methanol (-20° C)

UV: λ_{max} (log ε) = 284 nm (3.42); + NaOH: Keine Verschiebung

IR: (KBr): 1600 (C=C), 1490 (C=C), 840 cm^{-1} (H-C)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 90 MHz): δ = 1.66 (quin., 4 H,H-6_A, H-6_B,H-7_A,H-7_B), 2.14 (s,3 H,Ar-CH_3), 2.40 (bt,2 H,H-5_A, H-5_B), 2.63 (bt,2 H,H-8_A,H-8_B), 3.44 (s, 3 H,OCH_3) 3.73 (s,3 H,OCH_3), 6.39 (s,1 H, H-4)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 22.5 MHz): Tab. 18, S. 92

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 22.5 MHz): δ = 11.5 (Ar-$\underline{C}H_3$), 23.0 (C-7)*, 23.4 (C-6)*, 26.6 (C-8), 30.2 (C-5), 55.8 (OCH_3/C-3), 60.3 (OCH_3/C-2), 110.6 (C-4), 128.3 (C-8a) 130.2 (C-1), 132.4 (C-4a), 145.5 (C-2), 150.4 (C-3)

EI-MS (70 ev, Finnigan 4500):
m/z (rel. Int.) = 206 (100), 191 (48.2), 175 (17.4), 163 (19.7), 121 (14.4), 91 (12.3), 77 (5.4)

3.2.9 Fettsäuren des Samenfettes

1 g Petrolether-Extrakt wurde in einem 250 ml Jodzahlkolben mit 125 ml methanolischer Natriummethylatlösung versetzt. Nach Verdrängen des Luftsauerstoffes durch Einblasen von N_2 wurde der Ansatz verschlossen und im Dunkeln 12 Stunden stehen gelassen. Nach Verdünnen mit 125 ml H_2O wurden die entstandenen Fettsäuremethylester mehrmals mit je 40 ml Petrolether extrahiert; die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen bis zur neutralen Reaktion und über Na_2SO_4 getrocknet. Der Petrolether wurde im Vakuum abdestilliert und der Rückstand zur GC-Untersuchung verwendet.

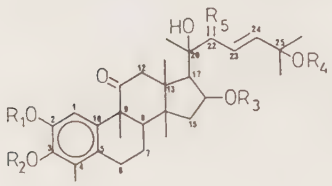
Palmitinsäure	(C 16)	4.2 %
Margarinsäure	(C 17)	0.1 %
Stearinsäure	(C 18)	53.0 %
Arachinsäure	(C 20)	0.9 %
Ölsäure	(C 18:1)	4.7 %
Linolsäure	(C 18:2)	4.3 %
α-Eleostearinsäure	(C 18:3, konj.)	31.0 %
nicht identifizierte Fettsäure		1.8 %

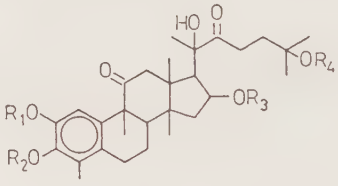
Gaschromatograph: Hewlett-Packard Modell 5720 A mit FID
Trennsäule: 1.8 m x 2 mm i.D. Glassäule mit 4 % Polyethylenglykolsuccinat auf Chromosorb G AW DMCS, 80-100 mesh.

Säulentemperatur: 80-200° C, 4° C/min,
Injektor-, Detektortemperatur: 250° C
Trägergas: 36 ml/min N_2

Fettkennzahlen:
Schmelzpunkt: 37-38° C
Brechungsindex: n_D^{40} = 1.4772
Unverseifbare Anteile: 0.76 %
Verseifungszahl: 195
Jodzahl: 75
UV (in Hexan p.a.): λ_{max} = 260.5 nm; 270.5 nm; 281.5 nm; (typisch für α-Eleostearinsäure)

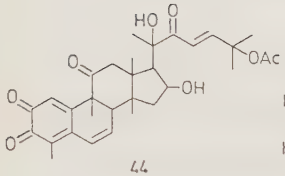
3.3 Strukturen der beschriebenen Verbindungen



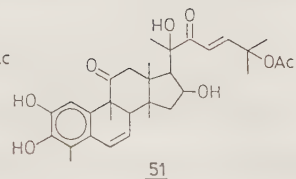


	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
20	β-Gluc	H	H	Ac	O
43	H	H	H	Ac	O
52	$(Ac)_4$-β-Gluc	Ac	Ac	Ac	O
53	Ac	Ac	Ac	Ac	O
56	β-Gluc	CH_3	H	Ac	O
57	CH_3	CH_3	H	Ac	O
65	$(Ac)_4$-β-Gluc	Ac	Ac	Ac	OAc,H
66	$(Ac)_4$-β-Gluc	Ac	Ac	Ac	OAc,H
77	β-Gluc	H	H	H	O
80	$(Ac)_4$-β-Gluc	Ac	Ac	H	O
82	β-Gluc	H	H	H	H,H
87	$(Ac)_4$-β-Gluc	Ac	Ac	H	H,H

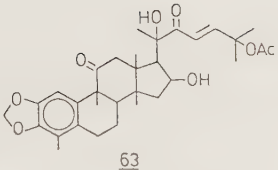
	R_1	R_2	R_3	R_4
73	β-Gluc	H	H	Ac
75	$(Ac)_4$-β-Gluc	Ac	Ac	Ac
76	β-Gluc	CH_3	H	Ac
78	β-Gluc	H	H	H
84	$(Ac)_4$-β-Gluc	Ac	Ac	H
88	H	H	H	Ac
89	Ac	Ac	Ac	Ac
90	CH_3	CH_3	H	Ac



44

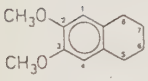


51

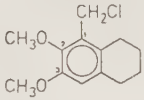


63

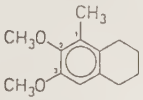
91 = 23,24-dihydro



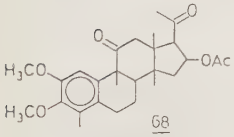
59



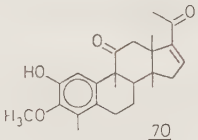
60



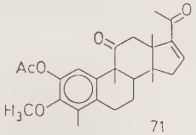
61



68



70



71

4. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der phytochemischen Untersuchung der Samen von Fevillea cordifolia, einer Cucurbitaceae.

Diese Samen werden in der Volksheilkunde Südamerikas gegen verschiedene Krankheiten verwendet [55,58-60]: Man benutzt sie z.B. in Form von Pflastern und Pasten zur Behandlung von Wunden und Schlangenbissen [58]. Abkochungen der Samen werden als starkes Emetikum, Purgans und Antidot bei Vergiftungen eingenommen [58-60].
Von besonderem Interesse sind authentische Berichte eines mittelamerikanischen Indianerstammes, bei dem die Einnahme der Samen als Kontrazeptivum und Antirheumatikum erfolgt [55].

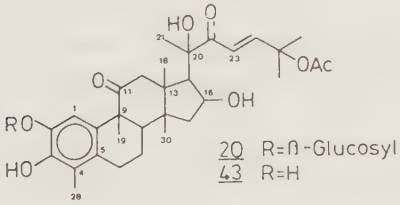
Da keine phytochemischen Erkenntnisse über Fevillea cordifolia (außer einer Analyse des Samenfettes [62]) bekannt sind, sollten Inhaltsstoffe in reiner Form isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden. Die Reinsubstanzen sollten außerdem in ausreichender Menge für pharmakologische Untersuchungen bereitgestellt werden, um die Wirkstoffe, die Träger der biologischen Aktivität, aufzufinden.

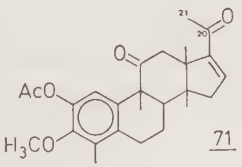
Hierzu wurden a) der Methylenchlorid- und b) der Methanol-Extrakt der Samen chromatographisch aufgetrennt; geeignete Trennsysteme wurden entwickelt und optimiert. Diese Untersuchungen führten zur Isolierung von 5 Glucosiden, [Fevicordin-glucosid A (20), B (73), C (77), D (78) und E (82)] und 2 Aglyka, [Fevicordin A (43) und B (88)].

Bei allen sieben Verbindungen handelt es sich um neue, bisher noch nicht beschriebene Naturstoffe.

Die Reingewinnung der glykosidischen Verbindungen stellte wegen der hohen Polarität und großen Strukturähnlichkeit hohe Ansprüche an die Separationsverfahren. Trennprobleme wurden vor allem durch Verteilungschromatographie an Gelen und die Tropfengegenstromverteilung (DCCC) gelöst.
Eine Schwierigkeit beim Umgang mit den (zuckerfreien) Fevicordinen besteht in deren relativ hoher Oxidationsempfindlichkeit; alle Handhabungen und chemischen Derivatisierungen wurden daher unter Sauerstoff- und weitgehendem Lichtausschluß vorgenommen.

Für die Strukturermittlung waren umfangreiche spektroskopische Untersuchungen an den isolierten Verbindungen, diversen chemisch modifizierten Derivaten und Abbauprodukten von wesentlicher Bedeutung (Übersicht s. Abb. 28, S. 127). Als besonders wichtig für die Strukturaufklärung erwiesen sich ^{13}C-NMR-Studien und hierbei speziell der Einsatz von 2D-NMR-Methoden, durch die die Verknüpfung der einzelnen Strukturbestandteile über die diversen quartären Kohlenstoff-Atome hinweg am Fevicordin A (43) möglich wurde.





Besondere Bedeutung im Zusammenhang mit der eindeutigen Festlegung der glucosidischen Bindung kommt Verbindung 71 zu, die aus Fevicordin A-glucosid durch eindeutigen Abbau gewonnen wurde.

In den Fevicordinen - wie wir die isolierten Substanzen benennen wollen - liegt eine neue Naturstoffklasse vor, die sich strukturell von den Cucurbitacinen ableitet: Bei ansonsten gleichem Kohlenstoff-Ringsystem und auch entsprechenden Funktionalitäten besteht der charakteristische Unterschied zu den Cucurbitacinen in einem aromatischen Ring A (unter "Verlust" einer der beiden Methyl-Gruppen an C-4). Die Fevicordine sind damit die ersten Vertreter der bisher nicht bekannten Gruppe der 29-Norcucurbitacine.

Die Strukturmodifikationen unter den Fevicordinen A - E bestehen in Variationen lediglich im Bereich der Seitenkette an C-17.
Die aufgeführten Fevicordin-glykoside sind 2-O-β-glykosidisch mit einer Glucose-Einheit verknüpft; die Aglyka können durch enzymatische Spaltung der glykosidischen Bindung mit Cellulase erhalten werden.
Die 2,3-Dihydroxy-Anordnung der Aglyka ist für deren Empfindlichkeit gegen Oxidationsmittel (z.B. O_2) verantwortlich und beruht auf der Dehydrierung zum o-Chinon bzw. 6,7-Dehydro-o-chinon, wie z.B. dem 6,7-Dehydro-fevicordin A-2,3-dion (44). Mit Ascorbinsäure lassen sich Lösungen der Aglyka stabilisieren und auch die o-Chinone wieder zu entsprechenden 6,7-Dehydro-Fevicordinen mit "Brenzcatechin"-Struktur reduzieren.

Die Analyse des Samenfettes ergab einen sehr hohen Anteil an Stearinsäure und auch an α-Eleostearinsäure (92), was in Übereinstimmung mit den publizierten Analysedaten über das Samenfett von Fevillea cordifolia ist [62].

Einige pharmakologische Tests wurden am Hauptinhaltsstoff Fevicordin A-glucosid (20), an dessen Aglykon Fevicordin A (43), sowie den Nebenglucosiden 73, 77, 78 und einigen Derivaten vorgenommen: 20 und 43 zeigten bei peroraler Applikation im Carrageenan-induzierten Rattenpfoten-Ödem eine signifikante entzündungshemmende Wirkung. Bei den Nebenglucosiden und chemisch modifizierten Derivaten wurde dagegen kein hemmender Einfluß auf das Entzündungsgeschehen beobachtet, sondern zum Teil ein umgekehrter, potenzierender Effekt. Dieser Befund deutet auf einen spezifischen Angriffspunkt von 20 und 43 hin und bietet eine Erklärungsmöglichkeit für die volksheilkundliche Verwendung von Fevillea cordifolia - Samen als Antirheumatikum.

Die berichtete kontrazeptive Wirkung von Samen der Fevillea cordifolia konnte bis jetzt noch nicht belegt werden: Die Testung des Sameninneren an Ratten ergab nach peroraler Applikation keinen antifertilen Effekt; die Untersuchungen mit reinem Fevicordin A-glucosid (20) sind noch nicht abgeschlossen.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. A.STOLL und E.JUCKER, Ullmann, Bd.3, S. 232, Verlag Urban und Schwarzenberg, 1953
2. E.MUTSCHLER, Arzneimittelwirkungen, 4. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1981
3. N.NEUWALD, Ullmann, Bd. 6, S. 62, Vlg. Urban + Schwarzenberg, 1955
4. R.HEGNAUER, Chemotaxonomie der Pflanzen, Bd. III, Birkhäuserverlag, Basel, 1964
5. R. HEGNAUER, Pharm. Acta Helv. 32, S. 334 (1957)
6. T.PECKOLT, Arch. Pharm. 159, S. 219 (1862)
7. T.PECKOLT, Chem. Zentralbl. II, S. 460 (1904)
8. M.BELKIN und D.B.FITZGERALD, J.Nat.Cancer Inst. 13, S. 139 (1952)
9. P.R.ENSLIN, J.Sci.Food Agric. 5, S. 410 (1954)
10. P.R.ENSLIN, T.G.JOUBERT und S.REHM, J.S.Afr. Chem. Inst. 7, S. 131 (1954)
11. P.R.ENSLIN, T.G.JOUBERT und S.REHM, J.Sci.Food Agric. 7, 646 (1956)
12. P.R.ENSLIN und D.E.A.RIVETT, J.Chem.Soc.(London), 3682 (1956)
13. P.R.ENSLIN, S.REHM und D.E.A.RIVETT, J.Sci.Food Agric. 8, 673 (1957)
14. P.R.ENSLIN, J.M.HUGO, K.B.NORTON und S.REHM, J.Chem.Soc.(London) 4779 (1960)
15. P.R.ENSLIN, J.M.HUGO, K.B.NORTON und S.REHM, J.Chem.Soc.(London) 4787 (1960)
16. P.R.ENSLIN und S.REHM, Z.Physiol.Chem. 303, 97 (1956)
17. P.R.ENSLIN und S.REHM, Proc.Linn.Soc.(London), 230 (1956-57)
18. S.REHM, P.R.ENSLIN, A.D.J.MEEUSE und J.H.WESSELS, J.Sci.Food Agric. 8 679 (1957)
19. S.REHM und J.H.WESSELS, J.Sci.Food Agric. 8, 687 (1957)

20. S.REHM, Ergeb. Biol. 22, 108 (1960)

21. D.LAVIE und S.SZINAI, J.Am.Chem.Soc. 80, 710 (1958)

22. D.LAVIE und Y.SHVO, Chem.Ind. (London), 429 (1959)

23. D.LAVIE und D.WILLNER, Proc.Chem.Soc. (London), 191 (1959)

24. D.LAVIE und Y.SHVO, Chem.Ind. (London), 403 (1960)

25. D.LAVIE und Y.SHVO, J.Am.Chem.Soc. 82, 966 (1960)

26. D.LAVIE und B.S.BENJAMINOV, Tetrahedron 20, 2665 (1964)

27. D.LAVIE, B.S.BENJAMINOV und Y.SHVO, Tetrahedron 20, 2585 (1964)

28. D.LAVIE, Y.SHVO, O.R.GOTTLIEB und E.GLOTTER, J.Org.Chem. (USA), 28, 1790 (1963)

29. D.LAVIE, Y.SHVO, O.R.GOTTLIEB, R.B.DESAI und M.L.KHORANA, J.Chem.Soc. (London), 3259 (1962)

30. D.LAVIE, Y.SHVO, O.R.GOTTLIEB und E.GLOTTER, Tetrahedron Lett. 615, (1961)

31. Y.SHVO, E.GLOTTER und D.LAVIE, Bull.Res.Counc.Isr., Sect. 11 A, 34, (1962)

32. W.T. DE KOCK, P.R.ENSLIN, K.B.NORTON, D.H.R.BARTON, B.SKLARZ und A.A.BOTHNER-BY, Tetrahedron Lett. 309 (1962)

33. O.BERG, Bull.Soc.Chim.Fr.[3] 17, 85 (1897)

34. J.POHLMANN, Phytochemistry 14, 1587 (1975)

35. Y.MIYAHARA, H.OKABE und T.YAMAUCHI,Chem.Pharm.Bull. 29, 1561 (1981)

36. H.OKABE, Y.MIYAHARA, T.YAMAUCHI, K.MIYAHARA und T.KAWASAKI, Chem. Pharm.Bull. 28, 2753 (1980)

37. I.BERGSTEINSSON und C.R.NOLLER, J.Am.Chem.Soc. 56, 1403 (1934)

38. S.KUWADA und Y.FUWA, J.pharm.soc. Japan 55, 87 (1935)

39. C.DJERASSI, A.BOWERS, S.BURNSTEIN, H.ESTRADA, J.GROSSMAN, J.HERRAN, A.J.LEMIN, A.MANJARREZ und S.C.PAKRASHI, J.Am.Chem.Soc. 78, 2312 (1956)

40. A.K.BARUA, J.Indian Chem.Soc. 35, 480 (1958)

41. H.N.KHASTGIER, J.Indian Chem.Soc. 35, 905 (1958)

42. E.C.BATHE-SMITH, J.Linn.Soc. London, Bot. 58, 95 (1962)

43. F.B.POWER und A.H.SALWAY, J.Am.Chem.Soc. 32, 346 (1910)

44. P.M.DUNHILL und L.FOWDEN, Biochem. J. 86, 388 (1963)

45. L.FOWDEN, Biochem. J. 81, 154 (1961)

46. SHENG-DIN FANG, Sci.Sin. (Peking) 10, 845 (1961)

47. W.M.HIGGINS und M.F.W.DUNKER, J.Am.Chem.Soc. 67, 153 (1945)

48. F.W.FREISE, Dtsch.Apoth.-Ztg. 44, 1480 (1929)

49. T.TAKAGI und Y.ITABASHI, Lipids 16, 546 (1981)

50. T.HALDER und V.N.GADGIL, Phytochemistry 22, 1965 (1983)

51. M.M.CHAKRABARTY, Naturwissenschaften 42, 344 (1955)

52. G.SCHNEIDER, Pharmazeutische Biologie, S. 171 ff., B.J.-Wissenschaftsverlag 1975

53. HAGERS Handbuch der pharmazeutischen Praxis VI, S. 32, Springer Verlag 1973

54. H.A.HOPPE, Drogenkunde Bd. 1, 8. Aufl., S. 501, de Gryter Verlag, Berlin 1975

55. M.CONSTENLA, Private Mitteilungen

56. H.E.BAILLON, Histoire des Plantes VIII, 378, Abb. 216/217, Paris 1886

57. N.J.B.G.GUIBOURT, Histoire Naturelle des Drogues Simples, ed. VI, Vol. 3, 265, Abb. 637, Paris 1869

58. J.F.MORTON, Atlas of Medicinal Plants of Middle America, Bahamas to Yucatan, S. 888, 1981

59. HAGERS Handbuch der pharm. Praxis IV, S. 988, Springer Verlag 1973

60. O.CASTRO, P.HOET, Plant. Med. Phytother. 16, 235 (1982)

61. C.WEHMER, Die Pflanzenstoffe, S. 1196, Jena-Verlag 1931

62. O.CASTRO und G.MORA, Ing.Cienc.Quim. 6, 181 (1982)

63. A.P.TULLOCH und L.BERGTER, Lipids 14, 996 (1979)

64. E.STAHL, Dünnschichtchromatographie, 2. Auflage, Springer Verlag 1967

65. Firmenprospekt: "Pharmacia Fine Chemicals" AB Box 175, S-75104 Uppsala, Sweden

66. J.PORATH und P.FLODIN, Nature (London) 183, 1657 (1959)

67. E.ÄNGGARD und H.BERGKVIST, J.Chromatogr. 50, 251 (1970)

68. H.RIPPBERGER und K.SEIFERT, Tetrahedron 31, 1561 (1975)

69. H.BECKER, W.CH.HSIEH und CH.D.VERELIS, Supplement Chromatographie 38, CIT-Verlag E. Giebler (1981)

70. L.C.CRAIG, J.Biol.Chem. 155, 519 (1944)

71. H.OTSUKA, Y.MORITA, Y.OGIHARA und S.SHIBATA, Planta med. 32, 9 (1977)

72. H.OTSUKA, S.KOBAYASHI und S.SHIBATA, Planta med. 33, 152 (1978)

73. R.GMELIN, Arzneimittelforsch. 13, 771 (1963)

74. D.LAVIE und E.GLOTTER, Fortschr. Chem.Org.Naturst. 29, 307 (1971)

75. M.HESSE, H.MEIER und B.ZEEH, Spektroskop. Methoden in der org. Chemie, 2. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1984

76. H.E.AUDIER und B.C.DAS, Tetrahedron Lett. 20, 2205 (1966)

77. C.A.RICE, K.S.RYMAL, O.L.CHAMBLIS und F.A.JOHNSON, J. Agric.Food Chem. 29, 196 (1981)

78. V.V.VEIDE und D.LAVIE, Tetrahedron 39, 317 (1983)

79. J.R.BULL, A.A.CHALMERS und PH.C.COLEMAN, S.Afr.J.Chem. 32, 27 (1979)

80. Y.YAMADA, K.HAGIWARA,K.IGUCHI und S.SUZUKI, Tetrahedron Lett. 24, 2099 (1977)

81. Y.YAMADA, K.HAGIWARA, K.IGUCHI, S. SUZUKI und H.Y.HSU, Chem.Pharm. Bull. 26, 3107 (1978)

82. I.CALIS und O.STICHER, J.Nat.Prod. 48, 108 (1985)

83. K.TORI, S.SEO, Y.YOSHIMURA, H.ARITA und Y.TOMITA, Tetrahedron Lett. 179, (1977)

84. K.SEIFERT und M.H.A.ELGAMAL, Pharmazie 32, 605 (1977)

85. X.FANG, C.H.PHOEBE, J.M.PEZZUTO, H.H.S.FANG und N.R.FARNSWORTH, J.Nat.Prod. 47, 988 (1984)

86. R.WAIBEL, Dissertation Universität Freiburg 1983

87. E.PRETSCH,T.CLERK, J.SEIBL und W.SIMON, Tabellen zur Strukturaufklärung org. Verbindungen mit spektroskopischen Methoden, 2. Aufl., Springer Verlag, Berlin 1981

88. T.A.WITTSTRUCK und T.H.WILLIAMS, J.Org.Chem. 38, 1542 (1973)

89. J.W.BLUNT und J.B.STOTHERS, Org. Magn. Reson. 9, 439 (1977)

90. J.R.HANSON und M.SIVERNS, J.Chem.Soc.Perkin Trans. 1, 1110 (1975)

91. W.BREMSER, L.ERNST, B.FRANKE, R.GERHARDS und A.HARDT, Chemical Shifts in ^{13}C-NMR-Spectroskopie, Tabellen, Verlag Chemie, 1982

92. W.BREMSER, B.FRANKE und H.WAGNER, Chemical Shifts in ^{13}C-NMR-Spektroskopie, Verlag Chemie 1982

93. G.BODENHAUSEN, R.FREEMAN, R.NIEDERMEYER und D.L.TURNER, J.Magn. Reson. 26, 133 (1977)

94. Informationsschrift zur 2D-NMR-Spektroskopie, Fa. Bruker, Karlsruhe 1982

95. M.KARPLUS, J.Chem.Phys. 30, 11 (1959)

96. R.MÜLLER und H.AUTERHOFF, Dtsch.Apoth.Ztg. 108, 1191 (1968)

97. H.S.MASON, J.Am.Chem.Soc. 70, 138 (1948)

98. HOUBEN-WEYL, Bd. 7/3b, S. 3 ff, Georg Thieme Verlag 1979

99. L.HORNER und K.STURM, Liebigs Ann.Chem. 597, 1 (1955)

100. H.HOPFF und H.R.SCHWEIZER, Helv.Chim. Acta 45, 312 (1962)

101. L.H.FIESER, J.Am.Chem.Soc. 52, 5204 (1930)

102. L.HORNER und W.DÜRCKHEIMER, Z. Naturforsch. 14 b, 741 (1959)

103. D.WALKER und J.HILBERT, Chem.Rev. 67, 153 (1967)

104. A.MÜHLENFELD, Private Mitteilung

105. W.A.AYER und W.I.TAYLOR, J.Chem.Soc. 3027 (1955)

106. R.HOLLENSTEIN und W.VON PHILIPSBORN, Helv.Chim.Acta 56, 320 (1973)

107. J.PAJAK und K.R.BROWER, J.Org.Chem. 50, 2210 (1985)

108. W.H.GERWICK und W.FENICAL, Tetrahedron Lett. 145 (1979)

109. ST.BERGER und A.RIEKER, Tetrahedron 28, 3123 (1972)

110. S.UKAI, K.HIROSE, A.TATEMATSU und T.GOTO, Tetrahedron Lett. 4999 (1967)

111. A.VERLEY und F.BÖLSING, Ber.Dtsch.Chem.Ges. 34, 3354 (1901)

112. D.C.DE JONG und K.BIEMANN, J.Am.Chem.Soc. 85, 2289 (1963)

113. K.HEYNS, H.F.GRÜTZMACHER, H.SCHARMANN und D.MÜLLER, Fortschr. Chem. Forsch. 5, 448 (1966)

114. M.SPITELLER-FRIEDMANN und G.SPITELLER, Fortschr. Chem. Forsch. 12 440 (1968)

115. J.WITZKE, Dissertation, Universität Freiburg 1982

116. W.WEINIGES und K.KÜNSTLER, Liebigs Ann. Chem. 1053 (1977)

117. W.STEGLICH und G.HÖFLE, Angew. Chem. 81, 1001 (1969)

118. P.F.VLAD, A.G.RUSSO und G.V.LAZUREVSKI, Khim.Prirudo.Soedin.Akad. Nauk UZ SSR 2, 29 (1966) [C.A. 65, 754 b; C.A. 53, 2277 d]

119. Y.TAGEDA und H.NISHIMURA, Phytochemistry 16, 1401 (1977)

120. T.MOMOSE und S.GOYA, Chem.Pharm.Bull. 7, 849 (1959)

121. M.BROWN und C.BERNHARD, Liebigs Ann. Chem. 2, 435 (1985)

122. R.O.HUTCHINS, B.E.MARYANOFF und C.A.MILEWSKI, J.Am.Chem.Soc. 93 1793 (1971)

123. E.D.HORNBAKER und A.BURGER, J.Am.Chem.Soc. 77, 5317 (1955)

124. E.J.KUPCHIK und R.E.CONOLLY, J.Org.Chem. 26, 4747 (1961)

125. M.MATSUI, Y.YAMAMURA, K.I.TAKEBAYASHI, Y.TAKAMI, K.KUNITAKE, F.KOGA, S.URASAKI und Y.WATANABE, J.Nat.Prod. 47, 858 (1984)

126. C.MOUREU, Bull.Soc.Chim.Fr. 15, 655 (1896)

127. W.BOUTHRONE und J.W.CORNFORTH, J.Chem.Soc (C), 1202 (1969)

128. H.FUJITA und M.YAMASHITA, Bull.Chem.Soc. Japan 46, 355 (1973)

129. I.R.C.BICK und R.A.RUSSEL, Aust.J.Chem. 22, 1563 (1969)

130. C.M.STARKS, J.Am.Chem.Soc. 93, 195 (1971)

131. A.MC KILLOP, J.C.FIAND und R.P.HUG, Tetrahedron 30, 1379 (1974)

132. A.P.BASHALL und J.F.COLLINS, Tetrahedron Lett. 40, 3489 (1975)

133. D.LAVIE, Y.SHVO und D.WILLNER, Chem. Ind. (London), 1361 (1958)

134. D.LAVIE, Y.SHVO und D.WILLNER, J.Am.Chem.Soc. 81, 3062 (1959)

135. D.E.A.RIVETT und F.H.HERBSTEIN, Chem. Ind. (London), 393 (1957)

136. D.LAVIE, B.S.BENJAMINOV und Y.SHVO, J.Chem.Soc. (London), 3543 (1964)

137. J.H.CLARK, H.L.HOLLAND und J.M.MILLER, Tetrahedron Lett. 3361 (1976)

138. B.KLIESER, L.ROSSA und F.VÖGTLE, Kontakte 1, 3 (1984)

139. G.G.JAKOBSON und N.E.AKHMETOVA, Synthesis, 169 (1983)

140. S.T.MURPHY, E.RITCHIE und W.C.TAYLOR, Aust.J.Chem. 28, 81 (1975)

141. HOUBEN-WEYL, Bd. 4/1 a, S. 450, Georg Thieme Verlag 1979

142. H.J.HADLER und A.C.KRYGER, J.Org.Chem. 25, 1896 (1960)

143. J.R.BULL und K.B.NORTON, J.Chem.Soc. (C) 1592 (1970)

144. E.P.OLIVETO und E.B.HERSHBERG, J.Am.Chem.Soc. 75, 488 (1953)

145. DAB 8-Kommentar, 2. Auflage, S. 104, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 1983

146. Y.YAMADA, K.HAGIWARA, K.IGUCHI und Y.TAKAHASHI, Chem.Lett., 319 (1978)

147. H.BUDZIKIEWICZ, Massenspektrometrie, 2. Auflage, Verlag Chemie 1980

148. P.R.ENSLIN, C.W.HOLZAPFEL und K.B.NORTON, J.Chem.Soc. (C), 964 (1967)

149. H.HAHN, Private Mitteilungen

150. J.R.BULL, A.J.HODGKINSON und A.TUINMAN, Tetrahedron 29, 2415 (1973)

151. C.DJERASSI und W.KLYNE, J.Chem.Soc. (London), 4929 (1962)

152. S.M.KUPCHAN, C.W.SIGEL, L.J.GUTTMAN, R.J.RESTIVO und R.F.BRYAN, J.Am.Chem.Soc. 94, 1353 (1972)

153. J.D.BULOCK, Biosynthese von Naturstoffen, BLV-Verlagsgesellschaft, München 1970

154. D.E.WOLF, C.H.HOFFMANN, P.E.ALDRICH, H.R.SKEGGS, L.D.WRIGHT und K.FOLKERS, J.Am.Chem.Soc. 78, 4499 (1956)

155. D.J.RAISTED und W.R.NES, J.Biol.Chem. 238, 1947 (1963)

156. D.W.VIDRINE und H.J.NICHOLAS, Biochem.Biophys. Res. Commun. 59, 340 (1974)

157. J.SLIWOWSKI und Z.KASPRZYK, Phytochemistry 13, 1441 (1974)

158. B.A.KNIGHTS, Chem. Berichte 9, 106 (1973)

159. G.BALLIANO, O.CAPUTO, F.VIOLA, L.DELPRINO und L.CATTEL, Phytochemistry 22, 909 (1983)

160. L.J. GOAD und T.W.GOODWIN, Prog.Pythochem. 3, 113 (1972)

161. G.SNATZKE und R.TSCHESCHE, Ullmann, Bd. 16, S. 412, Verlag Urban + Schwarzenberg, 1965

162. C.DJERASSI und R.MC CRINDLE, J.Chem.Soc. (London), 4034 (1962)

163. T.ITOH, Tsutomu TAMURA, T.M.JEONG, Toshitake TAMURA und T.MATSUMOTO, Lipids 15, 122 (1980)

164. L.CATTEL, G.BALLIANO, O.CAPUTO und F.VIOLA, Planta Med. 41, 328 (1981)

165. A.A.AMONKAR, T.G. MC CLOUD, C.-J.CHANG, J.A.SAENZ-RENAULD und J.M.CASSADY, Phytochemistry 24, 1803 (1985)

166. D.L.DREYER und E.K.TOUSDALE, Phytochemistry 17, 325 (1977)

167. Y.YAMADA, K.HAGIWARA, K.IGUCHI, Y.TAKAHASI und H.-Y.HSU, Phytochemistry 17, 1798 (1978)

168. S.M.KUPCHAN, R.M.SMITH, Y.AYNEHCHI und M.MARUYAMA, J.Org. Chem. 35, 2891 (1970)

169. J.KONOPA, A.MATUSZKIEWICZ, M.HRABOWSKA und K.ONOSZKA, Arneim.-Forsch. 24, 1741 (1974)

170. H.EDERY, G.SCHATZBERG und S.GITTER, Arch. Int. Pharmakodyn Ther. 130, 315 (1961) [C.A. 55, 22587 i]

171. S.REHM, Spectrum 4, 423 (1966) [C.A. 68, 2o584 a]

172. L.ROTH, M.DAUNDERER und K.KORMANN, Pflanzengifte, S.46, Vlg. ecomed

173. B.SHOHAT, A.M.BEEMER, S.GITTER und D.LAVIE, Experientia 28, 1203 (1972)

174. Fa. SCHERING, Unveröffentliche Versuche

175. Fa. SCHWABE, Unveröffentlichte Versuche

176. E.FISCHER, Ullmann, Bd.4, S. 724, Verlag Urban + Schwarzenberg, 1953

177. EUAB I/II, Kommentar, S. 330, 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1978

LEBENSLAUF

Name:	Ursula Hefter-Bübl
Geburtstag und Geburtsort:	29.4.1957 Weiden/Opf.
Eltern:	Günter Hefter, Unternehmer in Weiden/Opf. und Irma Hefter, geb. Goldmann, Schneiderin
Familienstand:	Verheiratet mit dem Arzt Dr. Robert Bübl seit dem 2.8.1984
Schulausbildung:	
September 1963 - Juli 1967	Volksschule Weiden/Opf.
September 1967 - Juni 1976	Elly-Heuss-Gymnasium Weiden/Opf. (Hochschulreife)
Studium:	
November 1976 - Mai 1982	Studium der Pharmazie an der Universität Erlangen/Nürnberg in Erlangen
September 1980 - 1982	Beschäftigung als studentische Hilfskraft im Institut für pharmazeutische Biologie der Universität Erlangen/Nürnberg
Praktisches Jahr:	
Juni 1982 - Dezember 1982	Öffentliche Apotheke in Fürth
Januar 1983 - Mai 1983	Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Erlangen/Nürnberg (Lehrstuhl Pharmazeutische Chemie)
12.7.1983	Pharmazeutische Prüfung
5.9.1983	Approbation zum Apotheker
Jetzige Tätigkeit:	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Erlangen/Nürnberg (Lehrstuhl Pharmazeutische Chemie)
Promotion:	
Januar 1983 - März 1986	Anfertigung der vorliegenden Arbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. H. Achenbach

Der Werdegang

Eines Tages geht man zum Professor
und wünscht zu werden sein Assessor.
Das Thema ist gestellt alsbald:
"Die Pille" aus dem Regenwald!
Fein geraspelt, den Soxhlet montiert,
Methanol in den Kolben und extrahiert.
Man füllt Säulen mit Sephadex oder SiO_2,
fühlt sich als Forscher, doch das geht vorbei.
wenn die Substanz aus vielen besteht
und man dann einen anderen Weg geht ...
Ist der Trennungsärger endlich vergessen,
werden die Krümel schnell vermessen.
UV, IR, los geht die Hatz,
nach dem begehrten Spektrensatz,
mit dessen Hilfe Du den Pflanzen,
entreißt das Rätsel der Substanzen.
Elektronenbeschuß in dem Instrument,
das mit Magnetfeldern Massen lenkt,
doch ist das Molekül zu groß,
findest Du ein Bruchstück bloß!
Dann wirbeln Protonen um ihren Spin,
und dieses ist wohl der Beginn,
daß man enthüllt die Nachbarschaft,
entwirft ein Stück Struktur ganz sacht.
^{13}C, off resonance, 2. Dimension,
darauf folgt eine Hypothese schon,
die mit Chemie bewiesen werden muß,
doch das führt auch zum guten Schluß,
so daß Du endlich - mit strahlender Miene -
verkündest froh: "'s sind Fevicordine!"